دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجهٔ کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

عنوان:

تعیین تاثیر اسید کافئیک بر اسپرماتوژنز موش سوری نر تحت تیمار با سیس پلاتین

نگارش:

سیما احمدی کردلر

اساتید راهنما:

دکتر رضا علی پناه مقدم

دکتر رامین سلیم نژاد

اساتید مشاور:

دکتر فرهاد جدی

دکتر علی نعمتی

شهریور ماه ۱۴۰۱

شماره پایان نامه: ۰۹۳

بسم الله الرحمن الرحيم

بسمه تعالی

دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل

گواهی اصالت پایان نامه

اینجانب سیما احمدی دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تایید می‌نمایم که :

- این پایان نامه بر اساس نتایج بررسیها/ تحقیقات انجام یافته توسط اینجانب تحت راهنمای سرکار خانم دکتر شکوفه بنائی بوده و بوسیله **خودم** انشا گردیده است و در صورت استفاده از نتایج پژوهش ها و یا آثار دیگران بلافاصله به مرجع مورد استفاده استناد شده است و در قسمت منابع و مآخذ مشخصات مرجع به طور کامل ذکر گردیده است.
- مسئولیت صحت مطالب مندرج در این پایان‌نامه به طور کامل با اینجانب است.
- این پایان نامه قبلا برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم سطح ، پایین تر یا بالاتر) درسایر دانشگاه ها وموسسات آموزش عالی ارائه نشده است.
- کلیه حقوق مادی و معنوی این پایان‌نامه و هر گونه محصول مستخرج از آن اعم از مقالات، چاپ کتاب و ثبت اختراع به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تعلق دارد و هرگونه استفاده از اطلاعات و یا نتایج، واگذاری اطلاعات به افراد دیگر، چاپ، تکثیر، نسخه‌برداری، ترجمه و اقتباس از این پایان‌نامه بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه علوم پزشکی اردبیل ممنوع است.
- کلیه مقالات مستخرج از این پایان‌نامه تحت نام دانشگاه علوم پزشکی اردبیل (Ardabil University of Medical sciences) به عنوان وابستگی نویسنده اول یا مسئول و با اطلاع و اجازه تمامی اساتید راهنما و مشاور به چاپ رسیده یا خواهد رسید.
- چنانچه در هر مقطع زمانی، خلاف مواردفوق ثابت شود، عواقب ناشی ازآن را می پذیرم و دانشگاه مجاز است با اینجانب مطابق با ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت برخورد قانونی، هیچ گونه ادعایی نخواهم داشت.

نام و نام خانوادگی دانشجو

امضا و تاریخ

- بدینوسیله **اصال و صحت** نتایج این پایان نامه مورد تأیید اینجانب، دکتر شکوفه بنائی استاد راهنما می باشد.

نام و نام خانوادگی استاد راهنما

امضا و تاریخ

تقدیم به

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است

به استوارترین تکیه گاهم ، دستان پرمهر پدرم

به دلگرم ترین نگاه زندگیم ، چشمان پرمحبت مادرم

که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره ای از دریای بی کران مهربانیتان را سپاس نتوانم بگویم.

امروز هستی ام به امید شماست و فردا کلید باغ بهشتم رضای شما

ره آوردی گران سنگ تر از این نداشتم تا به خاک پایتان نثار کنم ، باشد که حاصل تلاشم نسیم گونه غبار خستگیتان را بزداید.
تقدیم می کنم به خواهرانم
همسفران مهربان زندگیم
که باهم آغاز کردیم ، در کنار هم آموختیم و به امید هم به آینده چشم می دوزیم. قلبم لبریز از عشق به شماست و خوشبختی تان منتهای آرزویم.
و تقدیم می کنم به برادران عزیزم که زیباترین حس را در قلبم پروراند.
و در آخر تقدیم می کنم به

آنان که در راه کسب دانش راهنمایم بودند ؛
آنان که نفس خیرشان و دعای روح پرورشان بدرقه راهم بود.

تشکر و قدردانی

سپاس خدای را که سخنوران ، در
ستودن او بمانند و شمارندگان ،
شمردن نعمت های او ندانند و
کوشندگان حق او را گزاردن نتوانند.
اکنون که باید آغازی بر یک پایان
بنگارم ، بر خود لازم می دانم که از
استاد راهنمای محترم جناب آقای
دکتر رضاعلی پناه مقدم و دکتر
رامین سلیم نژاد و استاد مشاور

محترم جناب آقای دکتر فرهاد جدی و دکتر علی نعمتی به خاطر راهنمایی های ارزشمند نهایت تشکر و قدردانی را نمایم.

فهرست مطالب

عنوان.....صفحه

چکیده.....۲

فصل اول: مقدمه

(۱-۱) اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق ۴

(۱-۲) اهداف و فرضیات طرح ۴

(۱-۲-۱) هدف کلی طرح.....۴

(۱-۲-۲) اهداف اختصاصی طرح.....۴

(۱-۲-۳) فرضیات.....۵

(۱-۳) تعریف واژه های اختصاصی ۵

فصل دوم: بررسی متون

(۲-۱) ناباوری.....۸

(۲-۱-۱) عوامل موثر در ناباوری.....۸

(۲-۲) اپیدمیولوژی و میزان بروز ناباوری.....۹

(۲-۳) الیگوواسپرمی.....۱۰

(۲-۴)سیس پلاتین.....۱۰

(۲-۴-۱) آسیب بافتی بیضه ناشی از سیس پلاتین.....۱۲

(۲-۴-۱-۱) عوامل عمده آسیب بافتی بیضه ناشی از سیس پلاتین.....۱۲

(۲-۴-۱-۲) استرس اکسیداتیو.....۱۳

(۲-۵) سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، Nrf2 در محافظت آسیب بافتی بیضه.....۱۴

(۲-۵-۱) ژن گلوتاتیون پر اکسیداز (GPX).....۱۵

(۲-۵-۲) ژن سوپراکسد دیسموتاز(SOD).....۱۶

(۲-۵-۳) ژن فاکتور ۲ مرتبط با فاکتور هسته ای اریتروئید ۲ (Nrf2).....۱۷

(۲-۶) مالون دی آلدهید (MDA).....۱۹

(۲-۷) بررسی پارامتر های اسپرم ۲۱
(۲-۷-۱) تحرک اسپرم..... ۲۲
(۲-۷-۲) تعداد اسپرم..... ۲۳
(۲-۷-۳) شکل اسپرم (مورفولوژی)..... ۲۳
(۲-۸) اسیدکافئیک ۲۳
(۲-۹) بررسی متون ۲۴

فصل سوم: مواد و روش کار

(۳-۱) گروههای مورد مطالعه ۲۸
(۳-۲) فرایند کار جهت جمع آوری نمونه ها ی آزمایشگاهی از موش های سوری ۲۹
(۳-۳) مواد، ترکیبات شیمیایی و کیت های آنزیمی مورد استفاده در تحقیق ۳۱
(۳-۴) تجهیزات الکتریکی مورد استفاده ۳۲
(۳-۵) ظروف و وسایل مورد استفاده..... ۳۲
(۳-۶) روش کار ۳۳
(۳-۶-۱) آنالیز بیان ژن..... ۳۳
(۳-۶-۱-۱) استخراج RNA ۳۳
(۳-۶-۱-۲) سنجش میزان RNA استخراج شده ۳۴
(۳-۶-۱-۳) سنتز cDNA ۳۶
(۳-۶-۱-۴) طراحی پرایمر ۳۷
(۳-۶-۱-۵) Real Time PCR..... ۳۷
(۳-۶-۱-۶) آنالیز نتایج بیان ژن ۳۹
(۳-۶-۲) اندازه گیری سطح مالون دی آلدهید بافت بیضه..... ۳۹
(۳-۶-۳) اندازه گیری پروتئین در بافت بیضه به روش برادفورد..... ۴۱
(۳-۶-۴) روش انجام مطالعات بافت شناسی..... ۴۲
(۳-۶-۵) بررسی پارامتر های اسپرم..... ۴۶

(۳-۶-۵-۱) مورفولوژی اسپرم.....۴۶

(۳-۷) محاسبات آماری.....۴۷

فصل چهارم: نتایج

(۴-۱) اثر اسید کافئیک بر تغییرات هیستوپاتولوژی ناشی از سیس پلاتین در بافت بیضه..... ۴۹

(۴-۲) اثر اسید کافئیک و سیس پلاتین بر پارامترهای اسپرم.....۵۲

(۴-۳) نتایج تاثیر سیس پلاتین، اسید کافئیک تیمار شده با سیس پلاتین و اسید کافئیک روی بیان ژن گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و Nrf2 در گروه های مورد مطالعه.....۵۵

(۴-۳-۱) نتایج تاثیر سیس پلاتین، اسید کافئیک تیمار شده با سیس پلاتین و اسید کافئیک روی بیان ژن گلوتاتیون پر اک سیداز در سلول های زایا.....۵۵

(۴-۳-۲) نتایج تاثیر سیس پلاتین، اسید کافئیک تیمار شده با سیس پلاتین و اسید کافئیک روی بیان ژن سوپر اکسیددیسموتاز در سلولهای زایا.....۵۷

(۴-۳-۳) نتایج تاثیر سیس پلاتین، اسید کافئیک تیمار شده با سیس پلاتین و اسید کافئیک روی بیان ژن Nrf2 در سلول های زایا.....۵۹

(۴-۴) نتایج تاثیر سیس پلاتین، اسید کافئیک تیمار شده با سیس پلاتین و اسید کافئیک روی سطوح بافتی مالون دی آلدهید در سلول های زایا.....۶۱

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

(۵-۱) بحث و نتیجه.....۶۴

(۵-۲) محدودیت های مطالعه:..... ۷۶

(۵-۳) نتیجه گیری ۷۷

(۵-۴) پیشنهادات.....۷۸

منابع.....۷۹

ضمایم.....۹۲

فهرست اشکال

شکل ۱-۲: مکانیسم اثر داروی سیس پلاتین در مهار تکثیر سلولی..... ۱۳

شکل ۲-۲: تاثیر استرس اکسیداتیو و مکانیسم دفاعی آنتی اکسیدانی..... ۱۵

شکل ۳-۲: خنثی سازی گونه های فعال اکسیژن..... ۱۶

شکل ۴-۲: مسیر سیگنالینگ Nrf2-Keap1-ARE..... ۱۹

شکل ۵-۲: تأثیر استرس اکسیداتیو بر سلول های اسپرم..... ۲۱

شکل ۱-۳: تشریح موش..... ۳۰

شکل ۲-۳: نمودار آنالیز RNA استخراج شده توسط نانو دراپ..... ۳۵

شکل ۳-۳: نحوه اندازه گیری قطر خارجی لوله سمی نفر..... ۴۴

شکل ۴-۳: نحوه اندازه گیری قطر داخلی لوله سمی نفر..... ۴۵

شکل ۵ -۳: اسپرم زیر میکروسکوپ..... ۴۷

شکل ۱-۴: ساختمان میکروسکوپی بافت بیضه در گروه های مورد مطالعه..... ۵۰

فهرست نمودار

نمودار ۱-۴: مقایسه شاخص آسیب بافتی در گروه های مورد مطالعه.....۵۱

نمودار ۲-۴: مقایسه بیان ژن گلوتاتیون پر اکسیداز در گروه های مورد مطالعه ۵۶

نمودار ۳-۴: مقایسه بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز در گروه های مورد مطالعه.....۵۸

نمودار ۴-۴: مقایسه بیان ژن NRF2 در گروه های مورد مطالعه ۶۰

نمودار ۵-۴: مقایسه سطوح بافتی مالون دی آلدهید در گروه های مورد مطالعه.....۶۲

فهرست جداول

جدول ۱-۳: اطلاعات مربوط به توالی پرایمر های طراحی شده.....۳۷

جدول ۲-۳: مقادیر و ترکیبات تشکیل دهنده محلول مورد استفاده در ریل تایم..... ۳۸

جدول ۳-۳: برنامه دمایی و زمانی تعریف شده برای بررسی بیان ژن ها ۳۹

جدول ۴-۳ : امتیاز ارزیابی اسپرماتوژنز (نمره جانسن).....۴۵

جدول ۱-۴: مقایسه اثر اسید کافئیک و سیس پلاتین بر تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت بیضه.....۵۲

جدول ۲-۴: مقایسه اثر اسید کافئیک و سیس پلاتین بر پارامترهای اسپرم.....۵۴

فهرست علایم اختصاری

ARE	Antioxidant Response Element
CAT	Catalase
CIS	Cisplatin
KEAP	Kelch-Like ECH-Associated Protein1
MAF	Musculoaponeurotic Fibrosarcoma
MDA	Malondialdehyde
NEH	Nrf2-Ech Homology
NRF2	Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Superoxide Dismutase
TBARS	Thiobarbituric Acid

تعیین تاثیر اسید کافئیک بر اسپرماتوژنز موش سوری نر تحت تیمار با سیس پلاتین

چکیده

زمینه: امروزه ناباروری یکی از مشکلات عمده جوامع بشری می باشد. یکی از عوامل ناباروری در مردان الیگواسپرمی است. یکی از علل اصلی الیگواسپرمی استرس اکسیداتیو می باشد بنابراین مقابله با استرس اکسیداتیو بعنوان یکی از اساسی ترین استراتژی های درمانی محسوب می گردد.

هدف : بررسی اثر اسید کافئیک بر فرایند اسپرماتوژنز در آسیب بیضوی ناشی از سیس پلاتین در موش سوری نر

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۲۴ سر موش سوری بالغ نر با وزن تقریبی ۲۵-۳۰ گرم و سن تقریبی ۲ ماه استفاده گردید. موش های مورد مطالعه به چهار گروه ۶ تایی شامل ۱) گروه کنترل (دریافت سرم فیزیولوژی) ۲) گروه سیس پلاتین (دریافت سیس پلاتین با دوز mg/kg ۲/۵ به مدت ۵ روز پیاپی در روز هفتم و چهاردهم) ۳) گروه سیس پلاتین + اسید کافئیک (دریافت اسید کافئیک mg/kg ۶۰ + دریافت سیس پلاتین با دوز mg/kg ۲/۵ به مدت ۵ روز پیاپی در روز هفتم و چهاردهم) ۴) گروه اسید کافئیک(دریافت اسید کافئیک mg/kg ۶۰) تقسیم گردیدند. بعد از ۳۵ روز و ناشتایی ۱۰-۱۲ ساعته، گروه های مورد مطالعه با استفاده از تزریق داخل صفاقی کتامین-زایلازین بیهوش شده و بافت بیضه جداسازی گردید. نمونه های بافت بیضه به روش هماتوکسیلن-ائوزین رنگ آمیزی و تغییرات هیستوپاتولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی بیان ژنهای مورد مطالعه از روش Real-time PCR استفاده شد. میزان بافتی MDA به روش رنگ سنجی مورد ارزیابی گرفت.

یافته‌ها: میزان بیان ژن سوپراکسیددیسموتاز و Nrf2 در تمام گرو های مورد مطالعه نسبت به کنترل افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). میزان بیان ژن گلوتاتیون پراکسیداز در گرو های مورد مطالعه بجز گروه سیس پلاتین نسبت به کنترل افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). میزان بیان ژن سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و Nrf2 در گروه های دریافت کننده اسیدکافئیک و اسیدکافئیک تیمار شده با سیس پلاتین نسبت به گروه سیس پلاتین افزایش داشت ($p<۰/۰۵$). شاخص آسیب بافتی و ارتفاع اپتلیوم سلول های زایا در گروه دریافت

کننده اسیدکافئیک نسبت به گروه کنترل کاهش یافت و شاخص نمره جانسون در گروه های دریافت کننده اسیدکافئیک و اسیدکافئیک تیمار شده با سیس پلاتین افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). قطر خارجی سلول های زایا درگروه سیس پلاتین کاهش یافت ولی این کاهش معنی دار نبود و در گروه دریافت کننده اسیدکافئیک نسبت به گروه کنترل تغییر چندانی نکرد ($p>۰/۰۵$). کاهش سطوح بافتی مالون الدهید در گروه تحت تیمار با سیس پلاتین و اسیدکافئیک تیمار شده با سیس پلاتین نسبت به گروه کنترل معنی دار بود ($p<۰/۰۵$).

نتیجه گیری: بر اساس نتایج مطالعه ما نشان داده شد اسید کافئیک با دوز ۶۰ mg/kg علاوه بر بهبود شاخص های ارزیابی اسپرم مانند تعداد، تحرک، زنده مانی، مورفولوژی و نیز به حداقل رساندن آسیب وارده به سلول های تولید کننده اسپرم و نیز سلول های زایا باعث افزایش بیان ژن های سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در بافت بیضه شامل ژنهای سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و نیز ژن کنترل کننده بیان این آنزیم ها یعنی ژن Nrf2 شده بود. بنابراین نتایج ما جزو جدیدترین تحقیقات ملکولی انجام شده در زمینه مکانیسم احتمالی تاثیر اسید کافئیک در جلوگیری از آسیب اکسیداتیو بافت بیضه و ناباروری ناشی از آن می باشد.

کلمات کلیدی: اسپرماتوژنز، ناباروری، اسید کافئیک، موش سوری