



دانشگاه علوم پزشکی  
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

عنوان:

بررسی تاثیر نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره هیدروالکلی سیاه دانه  
روی تغییرات هیستوپاتولوژیک و بیان ژن های BAX، Bcl-2 و Caspase-3 در آسیب  
بافت بیضه القا شده با سیس پلاتین در موش سوری نر

نگارش:

سپیده اوچی اردبیلی

اساتید راهنما:

دکتر رضا علی پناه مقدم

دکتر رامین سلیم نژاد

اساتید مشاور:

دکتر فرهاد جدی

دکتر سولماز فیض پور

شهریور ماه ۱۴۰۱

شماره پایان نامه: ۰۹۴





## گواهی اصالت پایان نامه

اینجانب سپیده اوچی اردبیلی دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تایید می‌نمایم که :

- این پایان نامه بر اساس نتایج بررسیها/ تحقیقات انجام یافته توسط اینجانب تحت راهنمای جناب آقای دکتر رضا علی پناه مقدم 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 مأخذ مشخصات مرجع به طور کامل ذکر گردیده است.

- مسئولیت صحت مطالب مندرج در این پایان‌نامه به طور کامل با اینجانب است.

- این پایان نامه قبلاً برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم سطح ، پایین تر یا بالاتر) در سایر دانشگاه ها و موسسات 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، نسخه برداری، ترجمه و اقتباس از این پایان‌نامه بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه علوم پزشکی اردبیل ممنوع است.

- کلیه مقالات مستخرج از این پایان نامه 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 موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن 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 اصالت و صحت نتایج این پایان نامه مورد تأیید اینجانب، دکتر رضا علی پناه مقدم استاد راهنما می باشد.

نام و نام خانوادگی استاد

امضا و تاریخ

سپاس خدای را که سخنوران ، در  
ستودن او بمانند و شمارندگان ،  
شمردن نعمت های او ندانند

**تقدیم به**

به همسفر مهربان زندگیم ، سهند عزیزم

به استوارترین تکیه گاهم ، دستان پرمهر پدرم  
به دلگرم ترین نگاه زندگیم ، چشمان پرمحبت مادرم  
به پسر عزیزم ، سپهر م که وجودش آرام بخش قلب من است  
و در آخر تقدیم می کنم به آنان که در راه کسب دانش راهنمایم بودند  
؛آنان که نفس خیرشان و دعای روح پرورششان بدرقه راهم بود.

## تقدیر و سپاس

باتقدیم سپاس فراوان خدمت جناب آقای دکتر رضا علی پناه مقدم  
که درس آزادمردی و بزرگ منشی از ایشان آموختم و آموخته های  
علمی خود را مدیون لطف بی دریغشان هستم.

با تقدیر و تشکر از جناب آقای دکتر رامین سلیمی نژاد که بدون هیچ  
چشم داشتی دانسته های خود را در اختیارم قرار دادند و با نکته سنجی  
خود راهگشایم بودند.

و کمال تشکر را دارم از اساتید مشاور م جناب آقای دکتر فرهاد  
جدی و سرکار خانم دکتر سولماز فیض پور که همواره کمک ها و هم  
فکری های بی دریغشان روشن کننده راهم بود.

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

چکیده.....۱

## فصل اول : مقدمه

- ۴..... (۱-۱) اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق.....
- ۵..... (۲-۱) اهداف و فرضیات طرح.....
- ۵..... (۱-۲-۱) هدف کلی طرح.....
- ۵..... (۲-۲-۱) اهداف اختصاصی طرح.....
- ۵..... (۳-۲-۱) فرضیات.....
- ۶..... (۳-۱) تعریف واژه های اختصاصی.....

## فصل دوم : بررسی متون

- ۸..... (۱-۲) ناباروری.....
- ۸..... (۱-۱-۲) ناباروری در مردان و عوامل ایجاد کننده آن.....
- ۹..... (۲-۱-۲) اپیدمیولوژی و میزان بروز ناباروری.....
- ۱۰..... (۲-۲) نانو تکنولوژی.....
- ۱۱..... (۱-۲-۲) نانو ذرات.....
- ۱۱..... (۱-۱-۲-۲) نانو ذرات اکسید روی.....
- ۱۲..... (۲-۱-۲-۲) روش سنتز سبز نانو ذرات.....
- ۱۳..... (۳-۲) سیس پلاتین.....
- ۱۴..... (۱-۳-۲) آسیب بافتی بیضه ناشی از سیس پلاتین.....
- ۱۶..... (۱-۱-۳-۲) عوامل عمده آسیب بافتی بیضه ناشی از سیس پلاتین.....
- ۱۶..... (۱-۱-۱-۳-۲) آسیب DNA.....
- ۱۶..... (۲-۳-۱-۱-۲) استرس اکسیداتیو.....
- ۱۷..... (۲-۳-۱-۱-۳) التهاب.....
- ۱۷..... (۴-۱-۱-۳-۲) آپوپتوز.....
- ۱۸..... (۴-۲) نقش ژن های BAX, Bcl-2 و Caspase-3 در آسیب بافتی بیضه ناشی از سیس پلاتین.....

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| ۱۹.....                         | BAX ژن (۲-۴-۱)  |
| ۲۰.....                         | Bcl-2 ژن (۲-۴-۲)  |
| ۲۱.....                         | Caspase-3 ژن (۳-۴-۲)  |
| ۲۲.....                         | گیاه سیاه دانه..... (۵-۲)   |
| ۲۳.....                         | ترکیبات تیموکیمون و فلاونوئیدها..... (۶-۲)  |
| ۲۵.....                         | بررسی متون..... (۷-۲)   |
| <b>فصل سوم : مواد و روش کار</b> |   |
| ۲۹.....                         | گروه های مورد مطالعه..... (۳-۱)   |
| ۳۰.....                         | فرایند کار جهت جمع آوری نمونه های آزمایشگاهی آموزش ها..... (۲-۳)  |
| .....                           | ۳۲ (۳-۳) مواد، ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در تحقیق  |
| .....                           | ۳۲ (۴-۳) تجهیزات الکتریکی مورد استفاده  |
| ۳۳.....                         | ظروف و وسایل مورد استفاده..... (۵-۳)  |
| .....                           | ۳۴ (۶-۳) روش تهیه مواد استفاده شده در تحقیق   |
| ۳۴.....                         | روش تهیه عصاره..... (۳-۶-۱)   |
| ۳۴.....                         | روش تهیه نانوذره اکسید روی سنتز شده با عصاره هیدروالکلی سیاه دانه..... (۳-۶-۲)  |
| .....                           | انجام آزمایش های تاییدی نانو ذرات اکسید روی و نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره هیدروالکلی سیاه دانه..... (۳-۶-۳) |
| ۳۶.....                         | ..... (۷-۳) روش کار   |
| ۳۷.....                         | ..... (۱-۷-۳) آنالیز بیان ژن  |
| ۳۷.....                         | ..... (۱-۱-۷-۳) استخراج RNA   |
| ۳۸.....                         | ..... (۲-۱-۷-۳) سنجش میزان RNA استخراج شده  |
| ۴۰.....                         | ..... (۳-۱-۷-۳) سنتز cDNA   |
| ۴۱.....                         | ..... (۴-۱-۷-۳) طراحی پرایمر  |
| ۴۱.....                         | ..... (۵-۱-۷-۳) Real time -PCR  |

۴۳..... (۶-۱-۷-۳) آنالیز نتایج بیان ژن

..... ۴۳ (۲-۷-۳) روش انجام مطالعات بافت شناسی

..... ۴۶ (۳-۸) محاسبات آماری

#### فصل چهارم : نتایج

(۱-۴) اثر نانو ذرات اکسید روی، نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره سیاه دانه و عصاره سیاه دانه بر روی تغییرات

..... ۴۸ هیستوپاتولوژیک ناشی از سیس پلاتین در بافت بیضه

..... ۵۲ (۲-۴) بررسی های مربوط به تایید نانو ذرات و شکل نانو ذرات

(۱-۲-۴) بررسی الگوهای BET جهت تعیین مساحت سطح نمونه های نانو ذرات اکسید روی و نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با

..... ۵۲ عصاره سیاه دانه

(۲-۲-۴) بررسی آنالیز TGA یا توزین حرارتی برای نمونه های نانو ذرات اکسید روی و نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره

..... ۵۳ سیاه دانه

(۴-۳) نتایج مربوط به تاثیر نانو ذرات اکسید روی، نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره سیاه دانه و عصاره سیاه دانه روی بیان

..... ۵۵ ژن های BAX، Bcl-2 و Caspase-3 در گروه های مورد مطالعه

(۴-۳-۱) نتایج مربوط به تاثیر نانو ذرات اکسید روی، نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره سیاه دانه و عصاره سیاه دانه روی

..... ۵۵ بیان ژن BAX در گروه های مورد مطالعه

(۴-۳-۲) نتایج مربوط به تاثیر نانو ذرات اکسید روی، نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره سیاه دانه و عصاره سیاه دانه روی

..... ۵۷ بیان ژن Bcl-2 در گروه های مورد مطالعه

(۴-۳-۳) نتایج مربوط به تاثیر نانو ذرات اکسید روی، نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره سیاه دانه و عصاره سیاه دانه روی

..... ۵۹ بیان ژن Caspase-3 در گروه های مورد مطالعه

#### فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری

..... ۶۶ (۵-۱) نتایج و بحث

..... ۷۴ (۲-۵) محدودیت های مطالعه

..... ۷۵ (۳-۵) نتیجه گیری

..... ۷۶ (۴-۵) پیشنهادات

..... ۷۸ منابع





## فهرست اشکال

- شکل ۱-۲ : ساختار و مکانیسم اثر داروی سیس پلاتین..... ۱۴
- شکل ۲-۲ : مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز و نقش ژن های BAX، Bcl-2 و Caspase-3..... ۱۸
- شکل ۲-۳ : نقش ژن های BAX، Bcl-2 و Caspase-3 در آسیب بافتی بیضه ناشی از سیس پلاتین..... ۱۹
- شکل ۲-۴ : سیاه دانه گیاه، گل و دانه..... ۲۳
- شکل ۱-۳ : تشریح موش ها..... ۳۱
- شکل ۲-۳ : نمایی از بافت بیضه جدا شده در میکروتیوپ..... ۳۶
- شکل ۳-۳ : مراحل سنتز نانو ذرات اکسید روی و سنتز سبز نانو ذرات اکسید روی توسط عصاره هیدروالکلی سیاه دانه..... ۳۷
- شکل ۳-۴ : نمودار آنالیز RNA استخراج شده توسط نانو دراپ..... ۳۹
- شکل ۳-۵ : نحوه اندازه گیری قطر خارجی و داخلی لوله سمی نفر..... ۴۵
- شکل ۱-۴ : ساختمان میکروسکوپی بافت بیضه در گروه های مورد مطالعه..... ۴۹
- شکل ۲-۴ : نمودار BET برای نمونه های نانو ذرات اکسید روی و نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره سیاه دانه..... ۵۲
- شکل ۳-۴ : نمودار TGA برای نمونه های نانو ذرات اکسید روی و نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره سیاه دانه..... ۵۴

### فهرست نمودارها

نمودار ۴-۱ شاخص آسیب بافتی در گروه های مورد مطالعه..... ۵۰

نمودار ۲-۴ : مقایسه بیان ژن BAX در گروه های مورد مطالعه..... ۵۶

نمودار ۴-۳ : مقایسه بیان ژن Bcl-2 در گروه های مورد مطالعه..... ۵۸

نمودار ۴-۴ : مقایسه بیان ژن Caspase-3 در گروه های مورد مطالعه..... ۶۰

## فهرست جداول

- جدول ۳-۱: اطلاعات مربوط به توالی پرایمر های طراحی شده..... ۴۱
- جدول ۳-۲ : مقادیر و ترکیبات تشکیل دهنده محلول مورد استفاده در Real time PCR..... ۴۲
- جدول ۳-۳ : برنامه دمایی و زمانی تعریف شده برای بررسی بیان ژن ها..... ۴۳
- جدول ۳-۴ : امتیاز ارزیابی اسپرماتوژنز (نمره جانسن)..... ۴۶
- جدول ۴-۱ : مقایسه اثر نانو ذرات اکسید روی، نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره سیاه دانه، عصاره سیاه دانه و سیس پلاتین بر تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت بیضه..... ۵۱

## فهرست علائم اختصاری

|               |   |
|---------------|---|
| AIDS          | Acquired Immunodeficiency Syndrome      |
| APAF1         | Apoptotic ProteaseActivating Factor 1   |
| BAX           | BCL2-associated X protein               |
| Bcl-2         | B-cell lymphoma                         |
| BET           | Brunauer-Emmett-Teller                  |
| BH            | Bcl-2 homologous                        |
| Caspase-3     | Cysteine-Aspartic Proteases 3           |
| Cisplatin     | cis- dichlorodiaminoplatinum (II)       |
| COX-2         | Cyclooxygenase 2                        |
| Cytochrome C  | Cytochrome Complex                      |
| DNA           | Deoxyribonucleic acid                   |
| FADD          | Fas Associate Death Domain              |
| FASL          | Fas Ligand                              |
| FASR          | Fas Receptor                            |
| FT-IR         | Fourier-transform infrared spectroscopy |
| H & E         | Hematoxylin and Eosin                   |
| HIV           | Human Immunodeficiency Virus            |
| HNSCC         | Head and Neck Squamous Cell Carcinoma   |
| MOM           | Mitochondrial Outer Membrane            |
| N. sativa     | Nigella sativa                          |
| NF-kB         | Nuclear factor kappa B                  |
| NPs           | Nano Particles                          |
| RNA           | Ribonucleic acid                        |
| Real-Time PCR | Real Time Polymerase Chain Reaction     |
| TGA           | Thermogravimetric analysis              |
| UV            | Ultraviolet                             |
| XRD           | X-Ray diffraction analysis              |
| Zno-NPS       | Zinc Oxide Nano Particles               |

بررسی تاثیر نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره هیدروآلکلی سیاه دانه روی تغییرات هیستوپاتولوژیک و بیان ژن های BAX, Bcl-2, Caspase-3 در آسیب بافت بیضه القا شده با سیس پلاتین در موش سوری نر

### چکیده

زمینه: امروزه ناباروری یکی از مشکلات عمده اکثر کشورهای دنیا و از جمله ایران می باشد که عده کثیری را مبتلا کرده است. یکی از علل اصلی ناباروری مردان تخریب سلول های اسپرم ساز (سلول های زایا) توسط فرآیندی به نام آپوپتوز می باشد که به کاهش تعداد اسپرم منجر می گردد.

هدف: بررسی تاثیر نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره هیدروآلکلی سیاه دانه روی تغییرات هیستوپاتولوژیک و بیان ژن های BAX, Bcl-2, Caspase-3 در آسیب بافت بیضه القا شده با سیس پلاتین در موش سوری نر

مواد و روش ها: در این مطالعه از ۳۰ سر موش سوری بالغ نر با وزن تقریبی ۳۰-۲۵ گرم و سن تقریبی ۲ ماه استفاده گردید. موش های مورد مطالعه به صورت تصادفی در پنج گروه ۶ تایی شامل گروه کنترل (دریافت سرم فیزیولوژی از شروع مطالعه به مدت دو هفته + دریافت تک دوز سیس پلاتین ۷/۵ mg/kg در روز ۵ مطالعه)، گروه سیس پلاتین + عصاره سیاه دانه (دریافت عصاره سیاه دانه با دوز ۲۰۰ mg/kg از شروع مطالعه به مدت دو هفته + دریافت تک دوز سیس پلاتین ۷/۵ mg/kg در روز ۵ مطالعه)، گروه سیس پلاتین + نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره سیاه دانه (دریافت نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره سیاه دانه با دوز ۲۰۰ mg/kg از شروع مطالعه به مدت دو هفته + دریافت تک دوز سیس پلاتین ۷/۵ mg/kg در روز ۵ مطالعه)، گروه سیس پلاتین + نانو ذرات اکسید روی (در یافت نانو ذرات اکسید روی با دوز ۲۵ mg/kg از شروع مطالعه به مدت دو هفته + دریافت تک دوز سیس پلاتین ۷/۵ mg/kg در روز ۵ مطالعه). نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره سیاه دانه به روش سبز سنتز گردید. تایید سنتز نانو ذرات اکسید روی با استفاده از عصاره سیاه دانه توسط روش ها BET و TGA صورت گرفت. تغییرات هیستوپاتولوژیکی با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آنوزین مورد

ارزیابی قرار گرفت. بیان ژن های BAX، Bcl-2 و Caspase-3 به روش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** یافته های مطالعه نشان داد از نظر هیستوپاتولوژیک تیمار با نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره سیاه دانه به صورت معناداری ( $p < 0/05$ ) باعث کاهش شاخص آسیب بافتی ناشی از سیس پلاتین و بهبود نمره جانسون و ارتفاع اپی تلیوم زایا شد، و همچنین تیمار با نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره سیاه دانه به صورت معناداری ( $p < 0/05$ ) بیان ژن های آپوپتوزی BAX و Caspase-3 را کاهش داد و در مقابل باعث افزایش بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 گردید.

**نتیجه گیری:** بر اساس نتایج مطالعه ما مشخص شد استفاده از نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره سیاه دانه در مقایسه با عصاره سیاه دانه و نانو ذرات اکسید روی اثرات محافظتی بسیار موثرتری در جلوگیری از تغییرات هیستوپاتولوژیک و مهار آپوپتوز سلول های زایای بافت بیضه و در نهایت مقابله با ناباروری ناشی از کاهش تولید اسپرم دارد، بنابراین به نظر میرسد می توان از نانو ذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره سیاه دانه بعنوان یکی از روش های درمانی در جلوگیری از ناباروری در آینده استفاده نمود.

**کلمات کلیدی:** ناباروری، نانو ذرات اکسید روی، سیاه دانه، موش سوری، سیس پلاتین