دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

**دانشگاه علوم پزشکی اردبیل**
**دانشکده پزشکی**

**پایان نامه جهت اخذ درجهٔ کارشناسی ارشد علوم تشریحی**

**عنوان:**

# بررسی اثر کافئیک اسید بر تغییرات هیستوپاتولیوژیکی و فاکتور های استرس اکسیداتیو تخمدان در موش های سوری مدل نارسایی زودرس تخمدانی

**نگارش:**

**رضا جوانشیر**

**اساتید راهنما:**

**دکتر حسین کلارستاقی**

**دکتر رامین سلیم نژاد**

**استاد مشاور:**

**دکترمحمدقاسم گلمحمدی**

**بهمن سال ۱۴۰۲**

**شماره پایان نامه:۰۹۵**

**بسمه تعالی**

# گواهی اصالت پایان نامه

**اینجانب رضا جوانشیر دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تایید می‌نمایم که :**

- این پایان نامه بر اساس نتایج بررسیها/ تحقیقات انجام یافته توسط اینجانب تحت راهنمای جناب آقای دکتر حسین کلارستاقی 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 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 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.

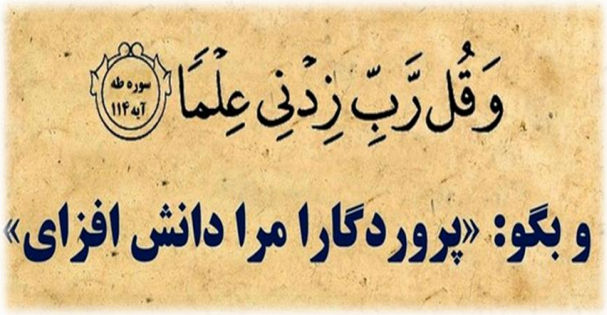
نام و نام خانوادگی دانشجو

امضا و تاریخ

- بدینوسیله **اصالت و صحت** نتایج این پایان نامه مورد تأیید اینجانب، دکتر حسین کلارستاقی استاد راهنما می باشد.

نام و نام خانوادگی استاد

امضا و تاریخ




تقدیم به

پدر، مادر، همسر و فرزندانم احسان و سبحان عزیز

# واساتید معزز و ارجمندم

# تقدیر و سپاس

شکر شایان نثار ایزد منان که توفیق را رفیق راهم ساخت تا این پایان نامه را به پایان برسانم. با تقدیر و تشکر شایسته از اساتید فرهیخته و فرزانه آقایان دکتر حسین کلارستاقی و دکتر رامین سلیم نژاد و دکتر محمد قاسم گل محمدی که با نکته های دلاویز و گفته های بلندشان، صحیفه های سخن را علم پرور نمودند و همواره راهنما و راه گشای نگارنده در اتمام و اکمال پایان نامه بودند. از خداوند متعال برایشان سلامتی، موفقیت و همواره یاد دادن را مسئلت دارم.

## فهرست مقالات منتشر شده از این پایان نامه:

1. Reza javanshir, Hossein Kalarestaghi, Ramin Salimnejad, Mohammad Ghasem Golmohammadi, Premature Ovarian Insufficiency Treatment with Human Mesenchymal Stem Cells: A. Review Article.

# فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**


**چکیده ..... م**

**فصل اول ..... ن**

**مقدمه ..... ن**

**اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق(۱-۱) ..... ۱**

**(۲-۱) اهداف و فرضیات طرح ..... ۶**

(۱-۲-۱) هدف کلی طرح ..... ۶

اهداف اختصاصی طرح(۲-۲-۱) ..... ۶

فرضیات (۳-۲-۱) ..... ۷

**(۳-۱)تعریف واژه های ا ختصاصی ..... ۸**

**فصل دوم ..... ۹**

**بررسی متون ..... ۹**

**(۲-۱) معرفی حیوان ..... ۱۰**

(۱-۱-۲) علت انتخاب موش سوری ..... ۱۰

(۲-۱-۲) دستگاه تناسلی موش سوری ماده ..... ۱۰

(۱-۲-۱-۲)تخمک گذاری: ..... ۱۱

**( ۲-۲) ناباروری ..... ۱۲**

**(۳-۲)کلیات نارسایی زودرس تخمدانی ..... ۱۴**

(۱-۳-۲)تعریف نارسایی زود رس تخمدانی: ..... ۱۴

(۲-۳-۲) عوامل هورمونی دخیل در نارسایی زود رس تخمدانی ..... ۱۵

(۲-۳-۲-۱)تئوری رادیکال های آزاد و نارسایی زود رس تخمدانی ..... ۱۶

(۲-۳-۲-۲)تئوری سیستم ایمنی ونارسایی زود رس تخمدانی ..... ۱۹

(۲-۳-۳) مدل نارسایی زود رس تخمدانی: ..... ۲۲

(۲-۳-۴) نارسایی زود رس تخمدانی و آنتی اکسیدان ها ..... ۲۴

**(۴-۲)کافئیک اسید ..... ۲۶**

**فصل سوم ..... ۲۹**

**مواد و روش کار ..... ۲۹**

**(۳-۱)حیوانات ..... ۳۰**

(۳-۱-۱)حجم نمونه ..... ۳۱

(۳-۱-۲)ملاحظات اخلاقی ..... ۳۱

(۳-۲)تجهیزات مورد استفاده ..... ۳۱

(۳-۲-۱)مواد، تجهیزات وترکیبات شیمیایی مورد استفاده در تحقیق ..... ۳۱

(۳-۲-۲)تجهیزات الکتریکی مورد استفاده ..... ۳۲

(۳-۲-۳) ظروف و وسایل مورد استفاده ..... ۳۳

(۳-۳-۱)نمونه برداری ..... ۳۸

(۳-۳-۲)اندازه گیری وزن بدن وتخمدان ها ..... ۳۸

(۳-۳-۳)سنجش هورمون های FSH و LH ..... ۳۸

(۳-۳-۴)بررسی هیستولوژیکی با میکروسکوپ نوری ..... ۳۹

(۳-۳-۴-۱) ارزیابی های هیستوپاتولوژی ..... ۴۳

(۳-۳-۵) سنجش فاکتورهای استرس اکسیداتیو ..... ۴۳

(۳-۳-۵-۱) سنجش لیپید پراکسیداسیون بافتی تخمدان ..... ۴۳

(۳-۳-۵-۲)سنجش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز بافتی تخمدان ..... ۴۵

(۳-۳-۴-۳) سنجش فعالیت سوپراکسید دسموتاز بافتی تخمدان ..... ۴۶

(۳-۳-۵-۳)آنالیز بیان ژن ..... ۵۰

(۳-۳-۵-۱) استخراج RNA ..... ۵۰

(۳-۳-۵-۲) سنتز CDNA ..... ۵۲

(۳-۳-۵-۳)طراحی پرایمر ..... ۵۳

(۳-۳-۵-۴)Real Time PCR ..... ۵۳

(۳-۳-۵-۵)آنالیز نتایج بیان ژن ..... ۵۵

**(۳-۴)روش تجزیه و تحلیل آماری ..... ۵۵**

**نتایج ..... ۵۶**

**(۴-۱) اثر PCI و کافئیک اسید بر وزن بدن و تخمدان: ..... ۵۷**

**(۴-۲)اثر PCI و کافئیک اسید بر سطح هورمون های جنسی ..... ۵۸**

**(۴-۳)اثر PCI و کافئیک اسید بر میزان لیپید پراکسیداسیون بافت تخمدان ..... ۵۸**

(۳-۴)اثر PCI و کافئیک اسید بر میزان فعالیت سوپراکسیداز دسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز بافت تخمدان ..... ۶۰
(۴-۴)اثر PCI و کافئیک اسید بر ظرفیت آنتی اکسیدانی تام بافت تخمدان ..... ۶۲
(۵-۴) اثر PCI و کافئیک اسید بر بیان ژن های Nrf ۲، SOD۱ و GPx۱ ..... ۶۲
(۵-۴) اثر PCI و کافئیک اسید بر هیستومورفومتری بافت تخمدان: ..... ۶۵
فصل پنجم ..... ۶۹
بحث و نتیجه گیری ..... ۶۹
بحث(۱-۵) ..... ۷۰
محدودیت های مطالعه(۲-۵) ..... ۷۶
نتیجه گیری: (۳-۵) ..... ۷۷
پیشنهادات(۴-۵) ..... ۷۸
منابع ..... ۷۹

# فهرست شکل ها، جدول ها ونمودارها

فهرست شکل ها:

شکل۱ - ۱تفاوت بافت شناسی تخمدان در حالت طبیعی و نارسایی زودرس تخمدانی (۶) ..... ۳

شکل( ۲-۱) تغییرات هورمونی در نارسایی زودرس تخمدان، باشد(۸). ..... ۴

شکل (۳-۱) تغییرات فاکتورهای پیش التهابی نسبت به فاکتورهای ضدالتهابی در شرایط نارسایی زودرس تخمدان ..... ۵

شکل۱-۲. خلاصه ای از عوامل ناباروری. ..... ۱۳

شکل۲-۲. انواع روش های القای POI و نشانگرها برای استقرار مدل موفق در جوندگان. ..... ۲۲

شکل۱-۳. روش تهیه اسمیر واژینال برای بررسی سیکل استروس. ..... ۳۵

شکل ۲-۳: مراحل سیکل استروس در موش ..... ۳۶

شکل ۳-۳: مراحل انجام مطالعه. ..... ۳۷

شکل ۱-۴. ساختمان بافت تخمدان در گروه های مورد مطالعه ..... ۶۶

فهرست جداول:

جدول( ۱-۳.) معرف های مورد نیاز برای سنجش گلوتاتیون پراکسیداز ..... ۴۵

جدول ۳-۲.  غلظت معرف های مورد نیاز برای سنجش سوپراکسید دسموتاز ..... ۴۶

جدول( ۳-۳.) غلظت معرف های مورد نیاز برای سنجش ظرفیت انتی اکسیدانی تام..... ۴۹

جدول ۴-۳: اطلاعات مربوط به توالی پرایمر های طراحی شده ..... ۵۳

جدول ۵-۳: مقادیر و ترکیبات تشکیل دهنده محلول مورد استفاده در ریل تایم..... ۵۴

جدول ۶-۳: برنامه دمایی و زمانی تعریف شده برای بررسی بیان ژن ها ..... ۵۴

جدول۱-۴. اثر POI و کافئیک اسید بر وزن بدن و تخمدان ..... ۵۷

جدول۲-۴. اثر POI و کافئیک اسید بر سطح هورمون های جنسی ..... ۵۸

فهرست نمودارها:

نمودار ۱-۴: بررسی سطح لیپید پراکسیداسیون بافت تخمدان در بین گروه ها ..... ۵۹

نمودار۲-۴: بررسی سطح سوپر اکسید دسموتاز بافت تخمدان در بین گروه ها..... ۶۰

نمودار۳-۴: بررسی سطح گلوتاتیون پراکسیداز بافت تخمدان در بین گروه ها ..... ۶۱

نمودار ۴-۴: بررسی سطح ظرفیت آنتی اکسیدانی تام بافت تخمدان در بین گروه ها..... ۶۲

نمودار ۵-۴. مقایسه اثر POI و کافئیک اسید بر بیان ژن Nrf2 در بافت تخمدان..... ۶۳

نمودار ۶-۴. مقایسه اثر POI و کافئیک اسید بر بیان ژن GPx1 در بافت تخمدان..... ۶۴

نمودار ۷-۴. مقایسه اثر POI و کافئیک اسید بر بیان ژن SOD1 در بافت تخمدان..... ۶۵

نمودار ۸-۴. مقایسه اثر POI و کافئیک اسید بر تعداد فولیکول ها در بافت تخمدان..... ۶۷

نمودار ۹-۴. مقایسه اثر POI و کافئیک اسید بر قطر فولیکول ها در بافت تخمدان ..... ۶۸

# فهرست علایم اختصاری

| | |
|---|---|
| AGE | Advanced glycation end products |
| ATP | Adenosine triphosphate |
| DHEA | Dihydro epi-androstenedione |
| FSH | Follicle-stimulating hormone |
| GPx | Glutathione peroxidase |
| GPx | Glutathione peroxidase |
| H&E | Hematoxsylin and Eosin |
| IL | Interleukin |
| LH | Luteinizing hormone |
| LPO | Lipid peroxidation |
| MDA | Malondialdehyde |
| ROS | Reactive oxygen species |
| SOD | Superoxide dismutase |
| TAC | Total Antioxidant Capacity |

# اثر کافئیک اسید بر تغییرات هیستوپاتولوژیکی و فاکتور های استرس اکسیداتیو تخمدان در موش های سوری مدل نارسایی زودرس تخمدانی

## چکیده

**زمینه:** نارسایی زودرس تخمدانی بیماری است که باعث اختلالات در باروری خانم ها در سنین زیر ۴۰ سالگی می شود. یکی از عوامل مهم در این بیماری استرس اکسیداتیو است که با مکانیسم های مختلف روند نارسایی زود رس تخمدانی را تسهیل می کند.

**هدف:** هدف این مطالعه بررسی اثر کافئیک اسید بر تغییرات هیستوپاتولوژیکی و فاکتور های استرس اکسیداتیو و تغییرات بیان ژن در تخمدان موش های سوری مدل نارسایی زودرس تخمدانی است.

مواد و روش‌ها: ۳۲ سر موش سوری به طور تصادفی به ۴ گروه (n =۸) ۱) کنترل؛ ۲)POI؛ ۳) POI+CAF و ۴) کافئیک اسید تقسیم شدند. القایPOI با تزریق دی گالاکتوز (۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی روزانه به مدت ۶ هفته انجام شد. کافئیک اسید (mg/kg ۶۰) به صورت داخل صفاقی (IP) و روزانه به مدت۴ هفته تزریق شد. ۱ روز پس از اخرین تزریق موش‌ها بیهوش شده و پس از خونگیری تخمدان ها خارج گردید. سپس سطح هورمون FSH و LH، فاکتورهای استرس اکسیداتیو و تغییرات هیستوپاتولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. یکی از تخمدان ها برای بررسی بیان ژن های Nrf2،SOD، Gpx و فاکتورهای استرس اکسیداتیو و دیگری برای بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیکی مورد استفاده قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که POI القا شده با دی گالاکتوز سطح MDA را به طور معناداری ($p<۰/۰۵$) افزایش و سطح SOD, GPx و TAC را کاهش ($p<۰/۰۵$) داد. همچنین در این گروه بیان ژن های Nrf2، SOD و Gpx نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین در این گروه تعداد و قطر فولیکول ها نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت ($p<۰/۰۵$). تجویز کافئیک اسید در گروه POI+CAF به طور معناداری باعث بهبودی در پارامترهای فوق گردید ($p<۰/۰۵$).

**کلمات کلیدی:** نارسایی زودرس تخمدان، دی گالاکتوز ؛ استرس اکسیداتیو، کافئیک اسید ، تخمک گذاری