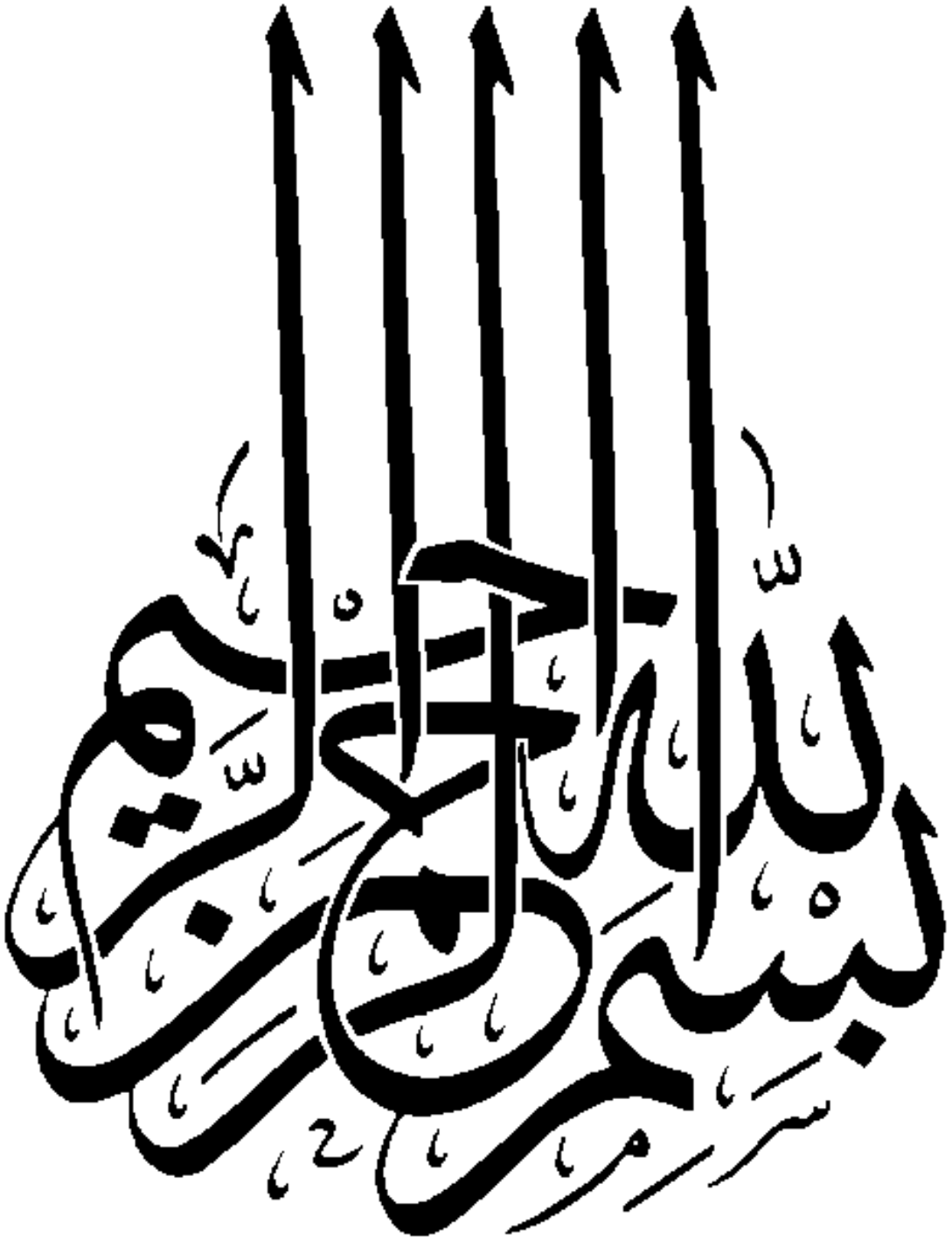

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه اراک

دانشکده علوم پایه

کارشناسی ارشد زیست شناسی

(گرایش سلولی -تکوینی)

ارزیابی اثر حفاظتی روغن سیاه‌دانه بر پارامترهای اسپرم در موش‌های بالغ نژاد NMRI تیمار شده با پارانونایل‌فنل.

پژوهشگر

لیـــلا کیخـا

استاد راهنما

دکتر سید محمد علی شریعت زاده

خرداد ۱۳۹۳

بسم ا...الرحمن الرحیم

ارزیابی اثر حفاظتی روغن سیاه‌دانه بر پارامترهای اسپرم در موش‌های بالغ نژاد NMRI تیمار شده با پارانونایل‌فنل.

توسط:

لیـــلا کیخـــا

پایان نامه

ارائه شده به مدیریت تحصیلات تکمیلی به عنوان بخشی از فعالیت های تحصیلی

لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته زیست-گرایش سلولی تکوینی

دانشگاه اراک

اراک-ایران

ارزیابی و تصویب شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: .....عالی.....

دکتر سید محمد علی شریعت زاده (استاد راهنما) ..... استاد

دکتر محمد حسین آبنوسی (داور - دانشگاه اراک) ..... دانشیار

دکتر حمیدرضا مومنی (داور- دانشگاه اراک)..... دانشیار

خرداد ۱۳۹۳

باشکر و سپاس فراوان از خداوند منان

الهی ادای شکر تو را هیچ زبانی نیست و دریای فضل تو را هیچ کران نیست، هدایت کن بر ما رهی که بهتر از آن نیست

خانواده ی من،

مثل "گندمند"

یعنی یک دنیا برکت و نعمت،

نبودن شان، قحطی و گرسنگی است،

و من چه خوشبختم که خوشه های طلائی گندم در اطرافم موج میزند،

مهربانی تان را قدر میدانم و آنرا در سیلوی جان نگهداری خواهم کرد.

پدر و مادر عزیزم: به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است.

به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند

در برابر وجود گرامیشان زانوی ادب بر زمین می نهم و با دلی مملو از عشق و محبت بر دستانشان بوسه می زنم.

بلندای وجودشان، همیشه استوار باد.

این مجموعه را به پدر و مادر عزیزم تقدیم می کنم.

تشکر و قدردانی

ضمن تشکر خالصانه خدمت همه کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم همراهی نموده اند، بر خود لازم می‌دانم مراتب سپاس صمیمانه خود را از استاد راهنمای گرامی ام **جناب آقای دکتر شریعت زاده** اعلام داشته و از زحمات بی دریغ و راهنمایی‌های ارزشمندشان که که در تمامی مراحل این تحقیق دلسوزانه یار و یاورم بودند و با صبر و حوصله از هیچ کمکی نسبت به اینجانب دریغ نکردند صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

از اساتید ارجمندم **جناب آقای دکتر آبنوسی و دکتر مومنی** که همیشه از محضر ایشان درس‌های فراوانی آموخته‌ام و زحمت بازخوانی و داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند کمال تشکر و سپاس را دارم.

از **پدر و مادرم** عزیز و مهربانم که با حمایت های همه جانبه خود و با فراهم نمودن محیطی مطلوب مرا در به اتمام رساندن این پایان نامه یاری نمودند، سپاس گذاری می نمایم.

از **خواهران و برادر** عزیزم که همواره مشوق و پشتیبانم در امر تحصیل بودند، تشکر می نمایم.

در پایان از **دوست عزیزم** خانم نرگس شریف و تمام دوستان و همکلاسی‌های خوبم که حضور گرمشان همراهم بود کمال تشکر را دارم.

از دوستان و همکاران در آزمایشگاه سلولی- تکوینی، به خصوص خانم **سمیرا نادری** و سایر دوستان به خاطر کمک ها و راهنمایی های ارزشمندشان متشکرم.

چکیده

ارزیابی اثر حفاظتی روغن سیاه‌دانه بر پارامترهای اسپرم در موش‌های بالغ نژاد NMRI تیمار شده با پارانونایل‌فنل.

پارانونایل‌فنل یک آلاینده زیست محیطی است که اثرات خود را از طریق اختلال در سیستم اندوکرینی و القای استرس اکسیداتیو بر روی سیستم تولیدمثلی نر اعمال می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر حفاظتی روغن سیاه‌دانه بر پارامترهای اسپرم در موش‌های تیمار شده با پارانونایل‌فنل بود.

موش‌های بالغ با میانگین وزنی ۳±۳۲ گرم، به ۴ گروه (n=۶): کنترل، روغن سیاه‌دانه (۵ml/kg/day)، پارانونایل‌فنل (۲۵۰mg/kg/day) و پارانونایل‌فنل+روغن سیاه‌دانه تقسیم و پس از ۳۴ روز تیمار دهانی، بیضه چپ خارج و برای مشاهدات هیستوپاتولوژیکی استفاده شد. ناحیه دمی اپی‌دیدیم چپ در محیط کشت Ham's F10 قطعه قطعه شد. اسپرم‌های آزاد شده به منظور بررسی برخی از پارامترهای اسپرم از جمله: تحرک، قابلیت حیات، تعداد و مورفولوژی مورد استفاده قرار گرفت. بررسی کیفیت کروماتین توسط رنگ‌آمیزی‌های هسته‌ای اکریدین اورانژ و آنیلین‌بلو انجام شد. همچنین غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) سرم خون اندازه‌گیری شد. داده‌ها با روش آماری One Way ANOVA و تست توکی (Tukey's test) آنالیز و تفاوت میانگین‌ها در حد (P<۰/۰۵) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

وزن بدن و بیضه در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). کاهش معنی‌داری در تعداد، قابلیت حیات، تحرک (P<۰/۰۰۱)، مورفولوژی طبیعی اسپرم (P<۰/۰۵)، قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم زایشی (P<۰/۰۰۱) و افزایش معنی‌داری در قطر لومن و سطوح MDA (P<۰/۰۰۱) در گروه پارانونایل‌فنل نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. در گروه پارانونایل‌فنل+روغن سیاه‌دانه، روغن سیاه‌دانه به طور قابل توجهی توانست اثرات زیان‌بار پارانونایل‌فنل بر پارامترهای فوق را جبران نماید. تجویز روغن سیاه‌دانه به تنهایی توانست موجب افزایش معنی‌داری در تعداد (P<۰/۰۵)، مورفولوژی طبیعی اسپرم (P<۰/۰۱) و تحرک (P<۰/۰۰۱) و کاهش معنی‌داری در سطوح MDA (P<۰/۰۰۱) نسبت گروه کنترل شود. پارانونایل‌فنل تاثیری بر روی تمامیت DNA و جایگزینی پروتامین بجای هیستون در اسپرم و قطر هسته سلول‌های اسپرماتوگونی نداشت (P>۰/۰۵).

روغن سیاه‌دانه به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت توانست اثرات نامطلوب پارانونایل‌فنل بر روی بافت بیضه و پارامترهای اسپرم در موش‌های بالغ را تا حد زیادی جبران کند.

واژگان کلیدی: بیضه، پارامترهای اسپرم، پارانونایل‌فنل، روغن سیاه‌دانه، موش.

فهرست مطالب

عنوان.....صفحه

❖ فهرست جداول

جدول ۱-۱: برخی از ترکیبات شیمیایی موجود در دانه‌های گیاه سیاه‌دانه ۴۱

جدول ۳-۱: مقایسه میانگین وزن بدن (گرم) و بیضه چپ (میلی‌گرم) موش‌ها در گروه‌های مختلف ۶۹

جدول ۳-۲: مقایسه میانگین قابلیت تحرک اسپرم در گروه‌های مختلف ۷۰

جدول ۳-۳: مقایسه میانگین تعداد، قابلیت حیات و مورفولوژی طبیعی اسپرم درگروه‌های مختلف.....۷۳

جدول ۳-۴: مقایسه میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز، قطر لومن، ضخامت اپی‌تلیوم زایشی و قطر هسته سلول‌های اسپرماتوگونی (µm) در گروه‌های مختلف.....۷۶

❖ جداول ضمیمه

جدول ۵-۱: وزن اولیه و ثانویه بدن (گرم) و وزن بیضه چپ (میلی‌گرم) موش‌ها در گروه‌های مختلف ۱۱۲

جدول ۵-۲: قابلیت تحرک اسپرم (جلورونده، درجا و ساکن) در گروه‌های مختلف ۱۱۳

جدول ۵-۳: تعداد، قابلیت حیات و مورفولوژی طبیعی اسپرم در گروه‌های مختلف.....۱۱۴

جدول ۵-۴: قطر لوله‌های منی‌ساز، قطر لومن و ضخامت اپی‌تلیوم زایشی (µm) در گروه‌های مختلف ۱۱۵

جدول ۵-۵: قطر هسته سلول‌های اسپرماتوگونی (µm) و غلظت MDA سرم خون (µM) در گروه‌های مختلف ۱۱۶

❖ نمودار

نمودار ۳-۱: مقایسه میانگین غلظت مالون‌دی‌آلدئید (µM) سرم خون در گروه‌های مختلف ۷۷

❖ فهرست اشکال

شکل ۱-۱: تصویری شماتیک از دستگاه تولیدمثلی موش نر.....۳

شکل ۱-۲: ساختار بیضه در موش نر ۵

شکل ۱-۳: تونیکا واژینالیس، تونیکا آلبوژینا، طبقه عروقی و تیغه‌های بیضه ۷

شکل ۱-۴: برش عرضی بیضه موش ۸

شکل ۱-۵: اپی‌تلیوم زایشی در لوله منی‌ساز بیضه موش ۹
شکل ۱-۶: مراحل مختلف (I-XII) اسپرماتوژنز در موش ۱۲
شکل ۱-۷: دیاگرام تکثیر و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی ۱۳
شکل ۱-۸: فرایند اسپرماتوژنز در موش ۱۵
شکل ۱-۹: مراحل مختلف اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز و اتصالات بین سلول‌های سرتولی و جنسی طی این فرایندها ۱۷
شکل ۱-۱۰: تصویری شماتیک از اسپرم موش ۱۸
شکل ۱-۱۱: تصویر سر اسپرم در سه گونه رت، موش و انسان ۱۹
شکل ۱-۱۲: مجاری تناسلی داخل بیضه‌ای و بخش‌های مختلف اپی‌دیدیم ۲۲
شکل ۱-۱۳: دستگاه تولیدمثلی موش نر به همراه غدد ضمیمه ۲۴
شکل ۱-۱۴: ساختار نونایل‌فنل و نونایل‌فنل پلی‌اتوکسیلات ۲۶
شکل ۱-۱۵: راه‌های در معرض قرار گرفتن انسان با آلاینده‌های زیست محیطی مختلف ۲۸
شکل ۱-۱۶: شباهت ساختاری p-NP و ۱۷_بتا استرادیول ۳۰
شکل ۱-۱۷: مکانیسم تولید ROS توسط سیتوپلاسم اضافی در اسپرم ۳۲
شکل ۱-۱۸: تصویری شماتیک از مسیرهای اصلی پراکسیداسیون لیپیدی در غشای اسپرم ۳۵
شکل ۱-۱۹: مسیرهای آپوپتوز در سلول‌های جنسی بیضه ۳۷
شکل ۱-۲۰: مکانیسم‌هایی که طی آن آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی رادیکال‌های آزاد را خنثی می‌کنند ۳۸
شکل ۱-۲۱: تصویر گیاه کامل، گل و دانه‌های Nigella sativa ۴۰
شکل ۱-۲۲: ساختار شیمیایی تیمول، تیموکوئینون و دی تیموکوئینون ۴۱
شکل ۲-۱: موش بالغ نژاد NMRI ۵۰
شکل ۲-۲: دسته‌بندی موش‌ها در گروه‌های مختلف ۵۰
شکل ۲-۳: تیمار دهانی موش به وسیله گاواژ ۵۱
شکل ۲-۴: ظرف حاوی پارانونایل‌فنل ۵۱
شکل ۲-۵: تشریح موش و برداشتن اپی‌دیدیم و بیضه چپ ۵۳

شکل ۲-۶: نحوه شمارش اسپرم‌ها بر روی لام نئوبار ۵۴
شکل ۲-۷: انواع مورفولوژی اسپرم ۵۶
شکل ۲-۸: توزین بیضه با ترازوی دیجیتالی A&DGF600 ..... ۵۹
شکل ۲-۹: ثابت کردن بیضه‌ها در فیکساتیو MDF..... ۵۹
شکل ۲-۱۰: روش تهیه برش IUR ۶۰
شکل ۲-۱۱: دستگاه پاساژ بافتی مدل Leica در حال پاساژ نمونه‌ها ۶۱
شکل ۲-۱۲: دستگاه بلوک‌گیری با پارافین و بلوک‌های حاوی بافت بیضه ۶۲
شکل ۲-۱۳: دستگاه برش‌گیری میکروتوم مدل Leitz1512 و حمام آب گرم ۶۳
شکل ۲-۱۴: ست رنگ‌آمیزی هایدن هاین آزان ۶۵
شکل ۲-۱۵: میکروسکوپ مدل B×41TE (Olympus) ۶۶
شکل ۲-۱۶: روش خون‌گیری از قلب موش ۶۷
شکل ۲-۱۷: دستگاه سانتریفوژ مدل Inc (Labnet International centrifuge) ۶۷
شکل ۳-۱: ارزیابی قابلیت حیات اسپرم‌های موش ۷۱
شکل ۳-۲: برخی از ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در گروه تیمار شده با پارانونایل‌فنل ۷۲
شکل ۳-۳: ارزیابی تمامیت DNA اسپرم‌های موش ۷۳
شکل ۳-۴: ارزیابی جایگزینی پروتامین بجای هیستون در کروماتین اسپرم‌های موش..... ۷۴
شکل ۳-۵: تصاویر میکروسکوپی از بافت بیضه موش‌های بالغ در گروه‌های مختلف ۷۵

فصل اول: مقدمه

۱-۱- بیان مسئله ۱
۱-۲- تولیدمثل جنسی در پستانداران ۲
۱-۳- دستگاه تولیدمثلی موش نر..... ۳
۱-۳-۱- بیضه‌ها ۴
۱-۳-۱-۱- تونیکا واژینالیس (Tunica Vaginalis)..... ۶

۱-۳-۱-۲- سفید پرده (Tunica albuginea)..... ۶
۱-۳-۱-۳- مدیاستن (میان پرده) و تیغه‌های بیضه..... ۶
۱-۳-۱-۴- سلول‌های لیدیگ..... ۷
۱-۳-۱-۵- لوله‌های منی‌ساز..... ۸
۱-۳-۱-۶- سلول‌های پشتیبان (سرتولی)..... ۱۰
۱-۴- اسپرماتوژنز (spermatogenesis)..... ۱۲
۱-۴-۱- تکثیر و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی..... ۱۳
۱-۴-۲- میوز..... ۱۴
۱-۴-۳- اسپرمیوژنز (Spermiogenesis)..... ۱۵
۱-۵- اسپرماتوزوئید..... ۱۸
۱-۵-۱- سر اسپرم..... ۱۸
۱-۵-۲- دم اسپرم..... ۱۹
۱-۶- مجاری تناسلی بیضه..... ۲۰
۱-۷- اپی‌دیدیم..... ۲۱
۱-۸- غدد ضمیمه..... ۲۲
۱-۹- آلاینده‌های زیست محیطی..... ۲۴
۱-۹-۱- معرفی نونایل‌فنل..... ۲۵
۱-۹-۲- پراکنش و کاربرد نونایل‌فنل..... ۲۶
۱-۹-۳- اثرات نونایل‌فنل..... ۲۸
۱-۹-۳-۱- سمیت حاد برای انسان..... ۲۸
۱-۹-۳-۲- اثر بر روی سیستم تولیدمثلی نر..... ۲۸
۱-۹-۳-۲-۱- اختلال در سیستم اندوکرینی..... ۲۹
۱-۹-۳-۲-۲- القای استرس اکسیداتیو..... ۳۱

۱-۱۰- ROS و منابع آن در سیستم تولیدمثلی نر ۳۱
۱-۱۱- نقش فیزیولوژیکی ROS در سیستم تولیدمثلی نر ۳۲
۱-۱۱-۱- پراکسیداسیون لیپیدی ۳۳
۱-۱۱-۱-۱- محصولات پراکسیداسیون لیپیدی ۳۵
۱-۱۱-۱-۲- روش تعیین و اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی ۳۶
۱-۱۱-۲- آسیب DNA و آپوپتوز القا شده توسط ROS ۳۶
۱-۱۲- آنتی‌اکسیدان ۳۷
۱-۱۲-۱- مشخصات عمومی سیاه‌دانه ۳۹
۱-۱۲-۲- ترکیبات شیمیایی سیاه‌دانه ۴۰
۱-۱۲-۳- خواص سیاه‌دانه ۴۲
۱-۱۲-۳-۱- فعالیت آنتی‌اکسیدانی سیاه‌دانه ۴۲
۱-۱۲-۳-۱-۱- بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی ۴۲
۱-۱۲-۳-۱-۲- اثرات هیپولیپیدیمیک و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی ۴۳
۱-۱۲-۴- سیاه‌دانه و بهبود عملکردهای تولیدمثلی ۴۳
۱-۱۳- مروری بر مطالعات گذشته ۴۴
۱-۱۳-۱- اثر نونایل‌فنل بر دستگاه تولیدمثلی نر ۴۴
۱-۱۳-۲- نقش سیاه‌دانه در جبران آسیب‌های ایجاد شده در سیستم تولیدمثلی نر توسط آلاینده‌های زیست محیطی ۴۶
۱-۱۴- هدف از مطالعه ۴۹

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- حیوانات ۵۰
۲-۲- روش تیمار ۵۱
۲-۳- طول مدت تیمار ۵۲
۲-۴- تشریح موش‌ها و برداشتن اپی‌دیدیم و بیضه چپ ۵۲

۲-۵- روش آماده کردن نمونه جهت بررسی پارامترهای اسپرم ۵۳
۲-۶- بررسی قابلیت تحرک اسپرم (Sperm motility) ۵۳
۲-۷- بررسی تعداد اسپرم (Sperm count) ۵۴
۲-۸- بررسی قابلیت حیات اسپرم (Sperm viability) ۵۵
۲-۹- بررسی ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم (Sperm morphological abnormalies) ۵۵
۲-۱۰- بررسی ماده ژنتیکی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های ویژه هسته ۵۶
۲-۱۰-۱- بررسی درصد اسپرم‌های با کروماتین آسیب دیده ۵۶
۲-۱۰-۲- بررسی درصد اسپرم‌های بالغ و نابالغ ۵۷
۲-۱۱- آماده‌سازی بافت بیضه جهت بررسی‌های هیستولوژیکی ۵۸
۲-۱۱-۱- ثابت کردن بیضه‌ها در فیکساتیو ۵۸
۲-۱۱-۲- برش‌گیری بیضه به روش IUR (Isotropic Uniform Random Sampling) ۵۹
۲-۱۱-۳- فرآیند پاساژ بافتی ۶۰
۲-۱۱-۴- قالب‌گیری و تهیه بلوک پارافینی ۶۲
۲-۱۱-۵- تهیه مقاطع بافتی ۶۳
۲-۱۱-۶- رنگ‌آمیزی مقاطع به روش هایدن هاین آزان (Heiden hain,s Azan) ۶۳
۲-۱۲- اندازه‌گیری قطر لوله‌های منی‌ساز، قطر لومن لوله‌های منی‌ساز، ضخامت اپی‌تلیوم زایشی و قطر هسته سلول‌های اسپرماتوگونی با استفاده از نرم‌افزار موتیک ۶۵
۲-۱۳- سنجش غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) ۶۶
۲-۱۳-۱- روش خون‌گیری از قلب موش ۶۶
۲-۱۳-۲- آماده‌سازی نمونه‌های خون ۶۷
۲-۱۳-۳- روش سنجش غلظت MDA ۶۸
۲-۱۴- روش آماری آنالیز داده‌ها ۶۸

فصل سوم: نتایج

۳-۱- وزن بدن و بیضه چپ ۶۹

۳-۲- آنالیز پارامترهای اسپرم ۶۹
۳-۲-۱- قابلیت تحرک اسپرم ۶۹
۳-۲-۲- تعداد اسپرم ۷۰
۳-۲-۳- قابلیت حیات اسپرم ۷۱
۳-۲-۴- ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم ۷۲
۳-۲-۵- بررسی ماده ژنتیکی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های ویژه هسته ۷۳
۳-۲-۵-۱- تغییر در ساختمان دورشته‌ای DNA اسپرم (رنگ‌آمیزی اکریدین اورانژ (AO)) ۷۳
۳-۲-۵-۲ -تغییرات هیستون طی فرایند بلوغ اسپرم (رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو (AB)) ۷۴
۳-۳- تغییرات هیستوپاتولوژیک بیضه ۷۴
۳-۴- قطر لوله‌های منی‌ساز، قطر لومن، ضخامت اپی‌تلیوم زایشی و قطر هسته سلول‌های اسپرماتوگونی (µm) ۷۶
۳-۵- پراکسیداسیون لیپیدی و سنجش غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) سرم خون ۷۷

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱- وزن بدن ۷۸
۴-۲- وزن بیضه ۸۰
۴-۳- آنالیز پارامترهای اسپرم ۸۱
۴-۳-۱- قابلیت تحرک اسپرم ۸۱
۴-۳-۲- تعداد اسپرم ۸۶
۴-۳-۳- قابلیت حیات اسپرم ۹۱
۴-۳-۴- ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم ۹۳
۴-۳-۵- بررسی ماده ژنتیکی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های ویژه هسته ۹۵
۴-۳-۵-۱- تغییر در ساختمان دورشته‌ای DNA (رنگ‌آمیزی اکریدین اورانژ (AO)) ۹۶
۴-۳-۵-۲- تغییرات هیستون طی فرایند بلوغ اسپرم (رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو (AB)) ۹۶
۴-۴- تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت بیضه ۹۷

۴-۵- قطر لوله‌های منی‌ساز، قطر لومن، ضخامت اپی‌تلیوم زایشی و قطر هسته سلول‌های اسپرماتوگونی....۹۸
۴-۶- پراکسیداسیون لیپیدی و غلظت مالون‌دی‌آلدئید سرم خونی ۱۰۲
نتیجه‌گیری.....۱۰۴
پیشنهادات.....۱۰۵
فصل پنجم: ضمیمه
۵-۱- عصاره‌های گیاهی.....۱۰۶
۵-۲- روش‌های عصاره‌گیری از گیاهان دارویی ۱۰۶
۵-۲-۱- روش خیساندن یا ماسراسیون (Maceration=Soaking=Steep) ۱۰۶
۵-۲-۲- روش پرکولاسیون یا لیکسیویاسیون (Percolation=Lixiviation) ۱۰۶
۵-۲-۳- روش دای جسشن (Digestion) ۱۰۷
۵-۲-۴- روش دم کردن (Infusion) ۱۰۷
۵-۲-۵- روش جوشاندن (Decocation) ۱۰۸
۵-۳- روش تهیه روغن سیاه‌دانه ۱۰۸
۵-۴- روش تهیه محلول‌ها و رنگ‌ها در مراحل پاساژ بافتی و رنگ‌آمیزی.....۱۰۸
فهرست منابع ۱۱۷

Abbreviations

AB……..……Aniline blue

ADP …….……Adenosine diphosphate

AO….……..…….……Acridine orange

APE……..…….…Alkylphenol polyethoxylate

b.w…….……..……..……....……Body wheight

cAMP…….…...……...…Cyclic adenosine monophosphate

CAT……..……..……..……Catalase

cm……..……..……..……Centimeter

EDCS……..…….……..…...…Endocrine disruptor chemicals

ER……..……..……Estrogen receptor

Fas……..……Apoptosis stimulating fragment

Fas L……..……Fas ligand

FSH……..……Follicle stimulating hormone

G6PD……..……Glucose-6-phosphate dehydrogenase

GPx…….……..……Glutathione peroxidase

GRD…….……..……Glutathione reductase

gr……..…..……..……Geram

HDL……..……..……High density lipoprotein

IUR……..…..……..……Isotropic Uniform Random Sampling

Kg……..……..……..……Kilogeram

L……..……..……..……..……Litter

LDL……..…….....……Low density lipoprotein

LH……..…….……Luteinising hormone

MDA……..…….…..……Malondialdehyde

MDF……..……..…….……..……Modified davidson’s fluid

mg……..……..…….……..…..……Milligram

µl……..……....…….……..…..……Microliter

µm..…….....……..…….……..…..…....Micrometer

µM……..……...…….……...……..……Micromolar

NADPH...…….....……...…Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NMRI..……..…..……..…….....Naval Medical Research Institute

nms...……....……Non-motility sperm

NP...…….....……Nonylphenol

NPES...…….……....Nonylphenol ethoxylates

npms...……...…….....Non-progressive motility sperm

p-NP.....…….……...……....Para-nonylphenol

pms...…….……..…...……..Progressive motility sperm

PUFA...……...…….……...…Polyunsaturated fatty acids

ROS...……...……...…….……Reactive oxygen spices

SD..……...…….....……...…….…..……Standard deviation

SD..……...…….....……...…….…..……Spragne-Dawley

SOD..……...…….....……...…….…..……Superoxide dismutase

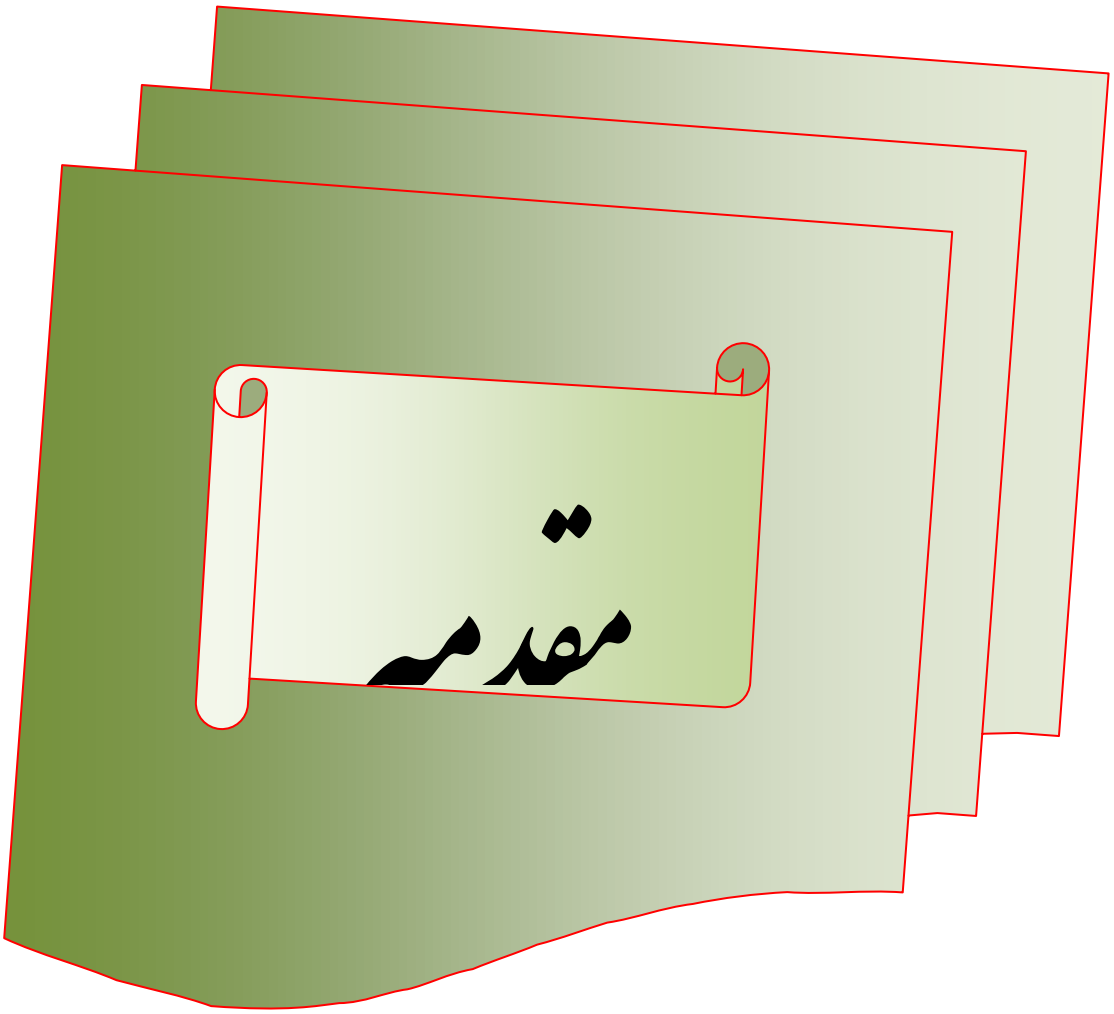
TBA..……...…….....……...…….…Thiobarbituric acid

TBARS..……...…….....……...……Thiobarbituric acid-reactive substance

TQ..……...…….....……...……Thymoquinone

WHO..……...……..…….....World Health Organization

فصل اول



۱-۱- بیان مسئله

مسائل مربوط به باروری و ناباروری یکی از مسائل پیچیده در علم پزشکی است. باروری اسپرم به پارامترهای مختلفی نظیر تعداد، تحرک و مورفولوژی بستگی دارد. شایع‌ترین علت ناباروری در مردان عدم توانایی آن‌ها در تولید تعداد کافی اسپرم‌های سالم و فعال است (Andersson *et al*., 2008; Esmael zadeh *et al*., 2007). یکی از فاکتورهای مهم در نقص عملکرد اسپرم و کاهش پارامترهای فوق و در نتیجه ناباروری مردان وضعیتی به نام استرس اکسیداتیو است که در اثر افزایش رادیکال‌های آزاد به خصوص متابولیت‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (Reactive Oxygen Spices) و عدم تعادل آن با آنتی‌اکسیدان‌ها به وجود می‌آید. شواهد روشنی وجود دارد که ROS به طور طبیعی در سیستم تولیدمثلی نر و حتی اسپرم‌ها تولید می‌شود. از طرفی اسپرماتوزوآ به دلیل داشتن مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع، پلاسموژن و اسفنگومیلین در غشای پلاسمایی و میزان فوق‌العاده ناچیز آنتی‌اکسیدان‌های سیتوپلاسمی، مستعد آسیب اکسیداتیو است (Agarwal *et al*., 2005; Badade and Samant, 2011). با توجه به آمار مربوط به کاهش میزان اسپرم در مردان امروزی نسبت به گذشته و افزایش ناباروری مردان در جوامع صنعتی، به نظر می‌رسد که برخی از مشکلات ایجاد شده در دستگاه تولیدمثلی نر از جمله اختلال در تولید، بلوغ و توانایی لقاح اسپرم که در نهایت منجر به ناباروری مردان می‌شود، ممکن است ناشی از در معرض قرار گرفتن با آلاینده‌های زیست محیطی (به عنوان فاکتورهای خارجی افزایش دهنده‌ی تولید ROS) باشد. پارانونایل‌فنل یکی از این آلاینده‌ها است. پارانونایل‌فنل یک سم زیست محیطی مهم و جزء مواد شیمیایی تخریب‌کننده سیستم اندوکرینی است که با القای استرس اکسیداتیو منجر به اختلال در سیستم تولیدمثلی نر می‌شود (de Jager *et al*., 1999b; Chitra *et al*., 2002; Han *et al*., 2004b; Momeni *et al*., 2009). در طرف مقابل رادیکال‌های آزاد، آنتی‌اکسیدان‌ها وجود دارند که تولید رادیکال‌های آزاد و آسیب اکسیداتیو را در بخش‌های مختلف بدن از جمله در بیضه و اسپرماتوزوآی بالغ کنترل و سرکوب می‌کنند. امروزه در میان آنتی‌اکسیدان‌های موجود، منابع گیاهی توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است و توجه ویژه‌ای به اثرات محافظتی آن‌ها در برابر سمیت القا شده توسط عوامل شیمیایی و آلاینده‌های

زیست محیطی شده است. سیاه‌دانه یکی از گیاهان دارویی است که به صورت گسترده از لحاظ فیتوشیمیایی و فارموکولوژیکی مورد مطالعه قرار گرفته است. روغن سیاه‌دانه غنی از ترکیبات دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اسکونجر (جاروکننده) رادیکال‌های آزاد است. در مطالعات گذشته نقش آنتی‌اکسیدانی روغن سیاه‌دانه در مهار نمودن اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد در دستگاه تولیدمثلی نر گزارش شده است (Danladi *et al*., 2013; Tawfeek *et al*., 2006). بنابراین با توجه به اثرات پارانونایل‌فنل مبنی بر القای استرس اکسیداتیو در دستگاه تولیدمثلی نر و نقش روغن سیاه‌دانه به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی، می‌توان فرض کرد که روغن سیاه‌دانه قادر است اثرات مخرب این آلاینده زیست محیطی را خنثی نماید. بنابراین این پژوهش، با هدف ارزیابی اثر حفاظتی روغن سیاه‌دانه بر روی پارامترهای اسپرم در موش‌های بالغ تیمار شده با پارانونایل‌فنل طراحی شد.

۱-۲- تولیدمثل جنسی در پستانداران

بقای نسل موجودات زنده، به یک عامل حیاتی و مهم به نام "تولیدمثل" بستگی دارد. عدم توانایی یک موجود در تولیدمثل، نسل آن موجود را در معرض انقراض و نابودی قرار خواهد داد. گامت‌ها و سلول‌های پیش‌ساز آن‌ها جمعا سلول‌های جنسی نامیده می‌شوند و برای عمل تولیدمثل اختصاص داده شده‌اند. دیگر سلول‌های بدن همگی سلول‌های سوماتیک نام دارند. این جداسازی سلول‌های سوماتیک و جنسی اغلب یکی از تمایزهای اولیه‌ای است که در حین تکوین جانور رخ می‌دهد. سلول‌های جنسی سرانجام به گنادها مهاجرت کرده و به گامت تمایز می‌یابند. تکوین گامت‌ها، گامتوژنزیس (gametogenesis) نامیده می‌شود و معمولا این فرآیند تا وقتی موجود زنده بالغ نشده است، کامل نمی‌گردد. پس از بلوغ و در حین تولیدمثل جنسی، گامت‌ها آزاد شده و برای ایجاد نسل جدید در لقاح شرکت می‌کنند.

گامت نر اسپرم یا اسپرماتوزوئید نام دارد. نقش نرها در تولیدمثل زودگذر است (ماده‌ها اغلب سرمایه‌گذاری بیشتری در ایجاد فرزند دارند) ولی به هر حال اسپرم نیمی از ژن‌های لازم برای تولید یک فرد کامل را به همراه می‌آورد تا پس از امتزاج دو گامت هاپلوئید یک تخم دیپلوئید حاصل شود. از