



وزارت علوم، تحقیقات و فناوری



دانشگاه دامغان  
دانشکده زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد بافت شناسی و جنین شناسی

تأثیر هورمون‌های استروئیدی بر بیان Oct4 و Sox2 در بافت رحم موش  
اواریکتومی

توسط:

مرضیه داودی

اساتید راهنما:

دکتر سعید زواره

دکتر سید حسن پایلاخی

اساتید مشاور:

دکتر محمد تقی قربانیان

دکتر سید رضا محبی

بهمن ماه ۱۳۹۲

به نام خدا

تأثیر هورمون‌های استروئیدی بر بیان Oct4 و Sox2 در بافت رحم موش  
اواریکتومی

بوسیله‌ی:  
مرضیه داودی

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی  
از فعالیت‌های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته‌ی:

زیست‌شناسی (بافت شناسی و جنین شناسی)  
از دانشگاه دامغان

ارزیابی و تأیید شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: عالی

دکتر سعید زواره، استادیار بیولوژی تولیدمثل دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد راهنما)

دکتر سید حسن پای‌لاخی، استادیار ژنتیک مولکولی دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد راهنما)

دکتر محمدتقی قربانپان، استادیار علوم تشریح دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد مشاور)

دکتر سید رضا محبی، استادیار ویروس شناسی دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد مشاور)

دکتر مریم حاجی قاسم کاشانی، استادیار علوم تشریح دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد داور)

دکتر فرید نوری، استادیار بیوفیزیک دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (استاد داور)

دکتر محمود اله‌دادی استادیار نوروفیزیولوژی دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان (نماینده تحصیلات تکمیلی)

بهمن ماه ۱۳۹۲

## تقدیم به پدر و مادر عزیزم

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم پدر و مادری فداکار نصیحت ساخته تا در سایه درخت پر بار وجودشان بیایم و از ریشه آن ها شاخ و برگ بگیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم .  
والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم چرا که این دو وجود پس از پروردگاریه هستی ام بوده اند و تم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند.  
آموزگارانی که برایم زندگی؛ بودن و انسان بودن را معنا کردند. حال این برگ سبزی است تخم درویش  
تقدیم آنان....

## تقدیم به برادرم و خواهران مهربانم

به همفران مهربان زندگیم کریم، مریم و زهرا که باهم آغاز کردیم، در کنار هم آموختیم و به امید هم به آینده چشم می‌دوزیم. قلمم لبریز از عشق به شماست و خوشبختی تان منتهای آرزویم.

این مجموعه را به خانواده عزیزم تقدیم می‌کنم.

# سپاسگزاری

ستایش برای خداست آن نخستین بی آغاز و آن واپسین بی انجام، ستایش برای خداست که خود را به ما شناساند و شیوه سپاسگزاری از خود را به ما آموخت و درهای علم به پروردگارش را به روی ما گشود و به اخلاص ورزیدن به توحید خود رهنمون ساخت. آری ستایش از آن توست، چرا که مرا فراموش نکرده‌ای و در یاد ندارم که حتی برای لحظه‌ای مرا به خود واگذاره باشی. پس چگونه فراموش کنم تو را که می‌باید اول و آخر هر سخن و سپاس باشی. تو در کنارم بوده‌ای و رهنمودهایت را دیده و دریافته‌ام و یادم می‌آید که همیشه می‌گفته‌اند، معلمی از آن پیامبران توست؛ پس من هم سهمی از این پیامبرانت برده‌ام.

با تقدیر و درود فراوان خدمت پدر و مادر بسیار عزیز، دلسوز و فداکارم که پیوسته جرعه نوش جام تعلیم و تربیت، فضیلت و انسانیت آن‌ها بوده‌ام و همواره چراغ وجودشان روشنگر راه من در سختی‌ها و مشکلات بوده است.

و شمع را طریقتی است که تا پایان راه یاریگرش خواهد بود و پروانه را معرفتی است که تا پایان راه کسب خواهد کرد و شمع سان خواهد سوخت و حکایت شمع حکایت دستان «استاد» بود که بی صدا می‌سوخت.

بدین ترتیب مراتب سپاس و قدردانی خود را از استاد راهنمای فاضل و عزیز خود جناب آقای دکتر سعید زواره که همواره با رهنمودهای ارزشمند خویش راه‌گشا و حامی و همراه من در این کار بودند، ابراز می‌دارم. با امتنان بیکران از مساعدت‌های بی‌شائبه‌ی استاد راهنمای گرامی جناب آقای دکتر سید حسن پایلاخی و نیز از اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر محمدتقی قربانیان و جناب آقای دکتر سید رضا محبی، که با دیدی عالمانه زحمت مشاوره‌ی این پایان‌نامه را به عهده داشتند، همچنین از سرکار خانم دکتر کاشانی و جناب آقای دکتر نوری که زحمت داوری این پایان‌نامه را به عهده داشتند و از نماینده تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر اله‌دادی کمال تشکر و سپاس‌گزاری را دارم.

اساتید عزیزم دکتر زواره، دکتر قربانیان، دکتر پایلاخی، دکتر محبی، دکتر صالح نیا، دکتر کاشانی، دکتر اله دادی، دکتر لشکر بلوکی، دکتر ابراری و دکتر گودرزی؛ شماروشنایی بخش تاریکی جان هستید و ظلمت اندیشه را نور می‌بخشید. چگونه سپاس گویم مهربانی و لطف شما را که سرشار از عشق و یقین است. چگونه سپاس گویم تأثیر علم آموزی شما را که چراغ روشن هدایت را بر کلبه‌ی محقر وجودم فروزان ساخته است. آری در مقابل این همه عظمت و شکوه شما مرا نه توان سپاس است و نه کلام وصف.

با سپاس فراوان خدمت دوستان عزیزم زینب، مریم، مرضیه، ریحانه، زهره، مریم آذری، رضا اسدزاده، ماندانا امام‌دوست، مریم رضائی، شیما خسروی، مریم بذرگر، مهدیه رضائی، نرجس هاشمی، ناهید رازقی، سمیرا دولت آبادی، مریم محل دشتیان، مریم قاسم زاده، بهناز عارف زاده، معصومه امیری و ملیحه نخعی؛ کارشناسان محترم آزمایشگاه آقای کوشا و خانم نفری و همچنین آقای فلاحتی که مرا صمیمانه و مشفقانه یاری نمودند.

سپاس بیکران بر همدلی و همراهی دوست دلسوز و مهربانم خانم نرگس باقری‌پور که سجده‌ی ایثارش گل محبت را در وجودم پروراند و وجود گهربارش لحظه‌های مهربانی را به من آموخت.

و با تشکر خالصانه خدمت همه کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نموده‌اند.

## چکیده

تأثیر هورمون‌های استروئیدی بر بیان Oct4 و Sox2 در بافت رحم موش اواریکتومی

به‌وسیله:

مرضیه داودی

رحم، بافتی پویاست که در پاسخ به تغییرات هورمونی طی چرخه‌های تولیدمثلی تحت فرآیندهای دوره‌ای بازسازی، تمایز و ریزش قرار می‌گیرد. در سال‌های اخیر سلول‌های بنیادی بالغ در آندومتر انسان و موش شناسایی شده‌اند. فاکتورهای رونویسی Oct4 و Sox2 برای حفظ پرتوانی سلول ضروری می‌باشند. در مطالعه حاضر بیان Oct4 و Sox2 بافت رحم موش اواریکتومی در مقایسه با موش‌های اواریکتومی تیمار شده با هورمون‌های تخمدانی اگزوزن با استفاده از ایمنوهیستوشیمی و Real time PCR بررسی شد. موش‌های ماده بالغ پس از تعیین سیکل با اسمیر واژن، اواریکتومی شدند. پس از ۲ هفته، موش‌ها با هورمون‌های استرادیول، پروژسترون و ترکیب استرادیول- پروژسترون به مدت ۵ روز تیمار شدند و پس از قربانی شدن، رحم برداشته شد. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، ایمنوهیستوشیمی نشانگرهای پرتوانی Oct4 و Sox2 بر روی برش‌های پارافینی ناحیه میانی شاخ رحم و Real time PCR از DNA مکمل mRNA نشانگرهای پرتوانی آماده شده از بافت رحم انجام شد. رنگ‌آمیزی ایمنوفلوروسنت، تفاوت در جایگاه بیان نشانگرهای پرتوانی Oct4 و Sox2 را در آندومتر و میومتر رحم گروه‌های تیمار نشان داد. مقایسه چرخه نرمال آستانه (Ct)، سطوح متفاوت بیان ژن- های نشانگر پرتوانی را در گروه درمان با استرادیول در مقایسه با سایر گروه‌ها نشان داد. مطالعه حاضر نشان داد که بیان Oct4 و Sox2 در رحم موش تحت تأثیر هورمون‌های استروئیدی است.

**واژگان کلیدی:** هورمون‌های استروئیدی، سلول‌های بنیادی رحم، نشانگرهای پرتوانی، اواریکتومی

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	فصل اول مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته .....
۲	۱-۱ سلول‌های بنیادی .....
۶	۲-۱ بازسازی آندومتر و سلول‌های بنیادی / پروژنیاتور آندومتر .....
۶	۱-۲-۱ بازسازی آندومتر در طول سیکل قاعدگی .....
۸	۲-۲-۱ تغییرات هورمونی و ساختاری رحم در هر فاز: سیکل ماهانه آندومتری و قاعدگی .....
۹	۱-۲-۲-۱ فاز تکثیری (استروژنی یا فولیکولی: روز ۴-۱۴) .....
۱۰	۲-۲-۲-۱ فاز ترشچی (پروژسترونی، لوتئال: روز ۱۴-۲۸) .....
۱۱	۳-۲-۲-۱ فاز قاعدگی .....
۱۲	۳-۲-۱ بازسازی آندومتر پس از یائسگی .....
۱۲	۴-۲-۱ ترمیم آندومتر به دنبال قاعدگی .....
۱۳	۵-۲-۱ تنظیم بازسازی آندومتر و نقش هورمون‌های استروئیدی و فاکتورهای رشد .....
۱۳	۱-۵-۲-۱ هورمون‌های استروئیدی .....
۱۵	۲-۵-۲-۱ فاکتورهای رشد .....
۱۶	۶-۲-۱ سلول‌های بنیادی بالغ در بافت‌های بازسازی شده .....
۱۶	۷-۲-۱ شواهدی برای سلول‌های بنیادی / پروژنیاتور آندومتر .....
۱۷	۱-۷-۲-۱ سلول‌های بنیادی / پروژنیاتور اپی‌تلیالی آندومتر .....
۱۷	۱-۷-۲-۱ سلول‌های کلونوژنیک (CFU) .....
۱۸	۲-۱-۷-۲-۱ Side population ( SP cells ) cells .....
۲۰	۳-۱-۷-۲-۱ Lable retaining cells (LRCs) .....
۲۲	۲-۷-۲-۱ سلول‌های بنیادی / پروژنیاتور استرومایی آندومتر (eMSC) .....
۲۲	۱-۲-۷-۲-۱ سلول‌های کلونوژنیک (CFU) .....
۲۳	۲-۲-۷-۲-۱ سلول‌های SP .....
۲۳	۳-۲-۷-۲-۱ Lable retaining cells (LRC) .....
۲۴	۸-۲-۱ منشأ سلول‌های بنیادی / پروژنیاتور آندومتر .....
۲۴	۱-۸-۲-۱ باقیمانده سلول‌های بنیادی جنینی .....
۲۵	۲-۸-۲-۱ سلول‌های بنیادی گردش خون با منشأ مغز استخوان .....
۲۷	۱-۲-۸-۲-۱ نقش سلول‌های مشتق شده از مغز استخوان در بازسازی آندومتر .....



۳-۱ کنترل استروئیدی آندومتر .....	۲۹
۱-۳-۱ بیان گیرنده استروئیدی آندومتر .....	۲۹
۲-۳-۱ پروژسترون و گیرنده‌های پروژسترونی .....	۳۱
۳-۳-۱ استروژن و گیرنده استروژنی .....	۳۳
۴-۱ نقش هورمون‌های استروئیدی و فاکتورهای رشد بر تنظیم سلول‌های بنیادی/ پروژنیاتور آندومتر و بازسازی آندومتر .....	۳۴
۱-۴-۱ بیان گیرنده استروژن در سلول‌های بنیادی/ پروژنیاتور آندومتر .....	۳۴
۲-۴-۱ نقش LRC در بازسازی آندومتر .....	۳۶
۳-۴-۱ نقش استروژن در تنظیم کننده‌های چرخه سلولی .....	۳۷
۵-۱ نشانگرهای پرتوان در سلول‌های بنیادی رحم .....	۳۸
۱-۵-۱ بیان نشانگرهای پرتوان Oct4 و Sox2 در آندومتر .....	۳۸
۲-۵-۱ بررسی اثرات NANOG, OCT4 و SOX2 در روند تکوین جنین انسان .....	۴۲
۳-۵-۱ عملکرد نشانگرهای پرتوان .....	۴۵
۴-۵-۱ کمپلکس تنظیم ژنی OCT4 و SOX2 .....	۴۶
۶-۱ چرخه‌ی استروس .....	۴۶
۱-۶-۱ شرح مراحل چرخه استروس .....	۴۷
۱-۱-۶-۱ پرواستروس .....	۴۸
۲-۱-۶-۱ استروس .....	۴۹
۳-۱-۶-۱ مت استروس .....	۴۹
۴-۱-۶-۱ دی استروس .....	۴۹
۲-۶-۱ کنترل هورمونی چرخه استروس .....	۴۹
۷-۱ تعریف مسأله .....	۵۱
۱-۷-۱ فرضیه‌ها .....	۵۲
۲-۷-۱ اهداف .....	۵۳
فصل دوم مواد و روش‌ها .....	۵۳
۱-۲ تهیه و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی .....	۵۵
۲-۲ روش انجام تحقیق و مراحل اجراء .....	۵۵
۱-۲-۲ تعیین و انتخاب مراحل چرخه استروس .....	۵۷
۱-۱-۲-۲ تعیین و انتخاب مراحل چرخه استروس براساس اسمیر واژن .....	۵۷
مواد و وسایل لازم جهت تهیه اسمیر واژن و تعیین چرخه استروس .....	۵۷
پروتوکول جمع آوری و تجزیه و تحلیل ترشحات واژن (اسمیرهای مرطوب) .....	۵۸

۶۰	روش آماده کردن رنگ متیلن بلو دو درصد جهت رنگ آمیزی لام اسمیر
۶۱	۲-۲-۲ آماده سازی موش‌های فاقد تخمدان
۶۱	عمل حذف تخمدان (Ovariectomy)
۶۱	نحوه اواریکتومی دو طرفه
۶۲	۱-۲-۲ مطالعه مورفولوژی و مورفومتريک رحم موش‌های فاقد تخمدان
۶۳	مواد و وسایل لازم برای تهیه مقاطع میکروسکوپ نوری و رنگ آمیزی H&E از شاخ رحم
۶۳	مراحل تهیه مقاطع میکروسکوپ نوری از شاخ رحم
۶۴	مراحل رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین از برش‌های شاخ رحم
۶۵	روش تهیه سالین بافر فسفات (PBS)
۶۶	روش تهیه پارافمالدئید ۴ درصد (Merck)
۶۶	روش تهیه رنگ هماتوکسیلین هریس
۶۷	روش تهیه رنگ ائوزین
۶۷	روش تهیه چسب آلبومین
۶۷	روش تهیه اسید الکل
۶۸	۳-۲-۲ بررسی حضور نشانگرهای پرتوانی (Sox2 و Oct4) با استفاده از تکنیک ایمنوهیستوشیمی
۶۸	فیکساسیون بافتی
۶۹	تثبیت در مشتقات فرمالین
۷۰	بازيابی آنتی ژنی
۷۱	مواد و وسایل مورد نیاز برای ایمنوهیستوشیمی
۷۲	مراحل انجام ایمنوهیستوشیمی
۷۴	روش تهیه محلول بافر سترات
۷۴	روش تهیه محلول TBS
۷۵	روش رقیق کردن سرم بز ۱۰ درصد
۷۵	روش رقیق کردن DAPI
۷۶	۴-۲-۲ بررسی میزان بیان ژن‌های Sox2 و Oct4 با استفاده از تکنیک Real time PCR
۷۶	۱-۴-۲-۲ استخراج RNA
۷۸	الکتروفورز ژل آگارز
۸۰	روش تهیه بافر الکتروفورز (TBE)
۸۱	روش تهیه EDTA (۰/۵ M)
۸۱	روش تهیه ژل آگارز ۱/۵ درصد

۸۱	.....cDNA سنتز ۲-۴-۲-۲
۸۲	..... Real time PCR واکنش ۳-۴-۲-۲
۸۳	..... Real time PCR مواد و وسایل مورد نیاز برای
۸۵	.....PCR ارزیابی کیفیت و صحت واکنش ۴-۴-۲-۲
۸۵	..... آنالیز آماری ۵-۴-۲-۲
۸۷	..... فصل ۳ نتایج
۸۸	..... ۱-۳ تعیین چرخه های تولیدمثلی
۸۸	..... ۱-۱-۳ تعیین چرخه های تولیدمثلی براساس اسمیر واژن
۸۸	..... ۱-۱-۱-۳ پرواستروس
۸۸	..... ۲-۱-۱-۳ استروس
۸۸	..... ۳-۱-۱-۳ مت استروس
۸۹	..... ۴-۱-۱-۳ دی استروس
۹۰	..... ۲-۳ تأثیر هورمون های تخمدانی اگزوزن بر بافت رحم موش مدل اواریکتومی براساس بررسی های مورفولوژی و مورفومتريک مقاطع بافت شناسی رحم
۹۰	..... ۱-۲-۳ مورفولوژی بافت رحم در موش های مدل اواریکتومی در گروه کنترل
۹۰	..... ۲-۲-۳ مورفولوژی بافت رحم در موش های مدل اواریکتومی در گروه شم
۹۱	..... ۳-۲-۳ مورفولوژی بافت رحم در موش های مدل اواریکتومی تیمار با استروژن
۹۱	..... ۴-۲-۳ مورفولوژی بافت رحم در موش های مدل اواریکتومی تیمار با پروژسترون
۹۱	..... ۵-۲-۳ مورفولوژی بافت رحم در موش های مدل اواریکتومی تیمار ترکیبی استروژن- پروژسترون
۹۸	..... ۳-۳ بررسی نشانگرهای سلول های بنیادی پرتوان (Oct4 و Sox2) با استفاده از تکنیک ایمنوهیستوشیمی
۹۸	..... ۱-۳-۳ بیان نشانگر سلول های بنیادی پرتوان Oct4 در رحم موش مدل اواریکتومی قبل و بعد از تیمار با هورمون های تخمدانی اگزوزن در سطح پروتئین
۹۸	..... ۱-۱-۳-۳ موش های مدل اواریکتومی گروه کنترل
۹۸	..... ۲-۱-۳-۳ موش های اواریکتومی گروه شم
۹۹	..... ۳-۱-۳-۳ موش های اواریکتومی تیمار با استروژن
۹۹	..... ۴-۱-۳-۳ موش های اواریکتومی تیمار با پروژسترون
۹۹	..... ۵-۱-۳-۳ موش های اواریکتومی تیمار ترکیبی استرادیول- پروژسترون
۱۰۰	..... ۲-۳-۳ بیان نشانگر سلول های بنیادی پرتوان Sox2 در رحم موش مدل اواریکتومی قبل و بعد از تیمار با هورمون های تخمدانی اگزوزن در سطح پروتئین
۱۰۰	..... ۱-۲-۳-۳ موش های اواریکتومی گروه کنترل
۱۰۰	..... ۲-۲-۳-۳ موش های اواریکتومی گروه شم
۱۰۰	..... ۳-۲-۳-۳ موش های اواریکتومی تیمار با ۱۷-بتا- استرادیول

۱۰۱	..... ۴-۲-۳-۳ موش‌های اواریکتومی تیمار با پروژسترون
۱۰۱	..... ۵-۲-۳-۳ موش‌های اواریکتومی تیمار ترکیبی استرادیول- پروژسترون
۱۲۴	..... ۴-۳ بررسی میزان بیان ژن‌های Oct4 و SOX2 با استفاده از تکنیک Real time PCR
۱۲۴	..... ۱-۴-۳ استخراج RNA
۱۲۴	..... ۲-۴-۳ بررسی میزان بیان ژن‌های نشانگر سلول‌های بنیادی پرتوان در رحم موش مدل اواریکتومی قبل و بعد از درمان با هورمون‌های تخمدانی اگزوزن
۱۲۴	..... ۳-۲-۴-۳ Real time PCR
۱۳۰	..... ۴-۲-۴-۳ ارزیابی کیفیت و صحت واکنش PCR
۱۳۰	..... ۵-۲-۴-۳ Real time PCR داده‌های
۱۳۲	..... فصل چهارم بحث و نتیجه‌گیری
۱۳۴	..... ۱-۴ تأثیر هورمون‌های استروئیدی اگزوزن بر مورفولوژی و هیستولوژی بافت رحم موش اواریکتومی
۱۳۸	..... ۲-۴ بررسی بیان نشانگرهای پرتوانی Oct4 و Sox2 در رحم موش مدل اواریکتومی تیمار با هورمون‌های استروئیدی در سطح پروتئین با استفاده از تکنیک ایمنوهیستوشیمی
۱۳۹	..... ۳-۴ بررسی بیان نشانگرهای پرتوانی Oct4 و Sox2 در رحم موش مدل اواریکتومی تیمار با هورمون‌های استروئیدی در سطح ژن
۱۴۴	..... ۴-۴ نتیجه‌گیری نهایی
۱۴۵	..... ۵-۴ پیشنهادات:
۱۴۶	..... فصل ۵ منابع

- شکل ۱-۱: رده بندی سلول های بنیادی ..... ۲
- شکل ۲-۱: (A) ساختار رحم، (B) تغییرات چرخه ای رحم در طول سیکل قاعدگی ..... ۶
- شکل ۳-۱: ساختار آندومتر انسان ..... ۸
- شکل ۴-۱: ظرفیت تمایزی سلول های CFU اپی تلیالی و استرومایی آندومتر انسان ..... ۱۸
- شکل ۵-۱: تصویر شماتیک از جایگاه سلول های بنیادی / پروژنیاتور آندومتر در آندومتر (A) انسان و (B) موش ..... ۲۱
- شکل ۶-۱: ساختار توالی دو ایزوفرم ER $\alpha$  و ER $\beta$  ..... ۳۰
- شکل ۷-۱: شکل شماتیک از بیان گیرنده استروژن در سلول های بنیادی / پروژنیاتور آندومتر و نیچ های سلول بنیادی / پروژنیاتور ..... ۳۵
- شکل ۸-۱: ساختارهای ژنی OCT4B1 و OCT4A, OCT4B ..... ۴۱
- شکل ۹-۱: شبکه مولکولی تنظیم شده بوسیله SOX2 و NANOG, OCT4 ..... ۴۵
- شکل ۱۰-۱: ترکیب سلولی مراحل مختلف چرخه استروس ..... ۴۸
- شکل ۱۱-۱: وقایع اندوکرینی در طول چرخه استروس موش ..... ۵۲
- شکل ۱-۲: نحوه صحیح مهار کردن موش سوری برای تهیه اسمیر واژن ..... ۵۷
- شکل ۲-۲: جمع آوری ترشحات واژن موش سوری ..... ۵۸
- شکل ۳-۲: پیتاژ کردن مایع واژن بر روی لام شیشه ای ..... ۵۸
- شکل ۴-۲: رنگ آمیزی مایع واژن روی لام با متیلن بلو دو درصد ..... ۵۸
- شکل ۵-۲: نحوه جراحی اواریکتومی ..... ۶۱
- شکل ۶-۲: دستگاه میکروتوم روتاری ..... ۶۳
- شکل ۱-۳: سیتولوژی اسمیر واژن طی چهار مرحله چرخه استروس طبیعی در موش کوچک آزمایشگاهی ..... ۸۹
- شکل ۲-۳: مقایسه سلول های موجود در اسمیر واژن موش سوری با چرخه استروس طبیعی و سلول های موجود در اسمیر واژن موش اواریکتومی و موش تیمار با هورمون ..... ۹۲
- شکل ۳-۳: مقاطع میکروسکوپ نوری و رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) از شاخ رحم موش اواریکتومی قبل و بعد از تیمار ..... ۹۳
- شکل ۴-۳: مقاطع میکروسکوپ نوری و رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) از شاخ رحم موش اواریکتومی تحت هورمون درمانی ..... ۹۴
- شکل ۳-۵: تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول های Oct4 مثبت در بافت رحم گروه کنترل (اواریکتومی) ..... ۱۰۲
- شکل ۳-۶: تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول های Oct4 مثبت در بافت رحم گروه کنترل (اواریکتومی) ..... ۱۰۳
- شکل ۳-۷: تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول های Oct4 مثبت در بافت رحم گروه تیمار با روغن کنجد (گروه شم) ..... ۱۰۴

شکل ۳-۸ : تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Oct4 مثبت در بافت رحم گروه تیمار با روغن کنجد (گروه شم) ..... ۱۰۵

شکل ۳-۹ : تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Oct4 مثبت در بافت ..... ۱۰۶

شکل ۳-۱۰ : تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Oct4 مثبت در بافت رحم گروه تیمار با ۱۷-بتا-استرادیول ..... ۱۰۷

شکل ۳-۱۱ : تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Oct4 مثبت در بافت رحم گروه تیمار با پروژسترون ..... ۱۰۸

شکل ۳-۱۲ : تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Oct4 مثبت در بافت رحم گروه تیمار با پروژسترون ..... ۱۰۹

شکل ۳-۱۳ : تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Oct4 مثبت در بافت رحم گروه تیمار ترکیبی استرادیول- پروژسترون ..... ۱۱۰

شکل ۳-۱۴ : تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی بافت هیپوکمپ مغز و بیضه بالغ در گروه کنترل مثبت Oct4 ..... ۱۱۱

شکل ۳-۱۵ : تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی بافت رحم در گروه کنترل منفی Oct4 و Sox2 (گروه فاقد آنتی بادی اولیه) ..... ۱۱۲

شکل ۳-۱۶ : تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی بافت هیپوکمپ مغز و بیضه بالغ در گروه کنترل مثبت Sox2 ..... ۱۱۳

شکل ۳-۱۷ : تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Sox2 مثبت در بافت رحم گروه کنترل (اواریکتومی) ..... ۱۱۴

شکل ۳-۱۸ : تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Sox2 مثبت در بافت رحم گروه کنترل (اواریکتومی) ..... ۱۱۵

شکل ۳-۱۹ : تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Sox2 مثبت در بافت رحم گروه تیمار با روغن کنجد (گروه شم) ..... ۱۱۶

شکل ۳-۲۰ : تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Sox2 مثبت در بافت رحم گروه تیمار با روغن کنجد (گروه شم) ..... ۱۱۷

شکل ۳-۲۱ : تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Sox2 مثبت در بافت رحم گروه تیمار با ۱۷-بتا-استرادیول ..... ۱۱۸

شکل ۳-۲۲ : تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Sox2 مثبت در بافت رحم گروه تیمار با ۱۷-بتا-استرادیول ..... ۱۱۹

شکل ۳-۲۳ : تصاویر فاز کنتراست مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Sox2 مثبت در بافت رحم گروه تیمار با پروژسترون ..... ۱۲۰

شکل ۳-۲۴ : تصاویر فاز کنتراست مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Sox2 مثبت در بافت رحم گروه تیمار با پروژسترون ..... ۱۲۱

شکل ۳-۲۵ : تصاویر فاز کنتراست مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Sox2 مثبت در بافت رحم گروه تحت تیمار ترکیبی با استرادیول- پروژسترون ..... ۱۲۲

شکل ۳-۲۶: تصاویر فاز کنتراست مربوط به ایمنوهیستوشیمی سلول‌های Sox2 مثبت در بافت رحم گروه تحت تیمار ترکیبی با استرادیول- پروژسترون	۱۲۳
شکل ۳-۲۷: ژل آگارز RNA های انتخاب شده در گروه‌های مختلف برای سنتز cDNA	۱۲۴
شکل ۳-۲۸: واکنش Real time PCR ژن ACTIN	۱۲۵
شکل ۳-۲۹: منحنی ذوب واکنش Real time PCR ژن ACTIN	۱۲۵
شکل ۳-۳۰: واکنش Real time PCR ژن Oct4	۱۲۶
شکل ۳-۳۱: منحنی ذوب واکنش Real time PCR ژن Oct4	۱۲۶
شکل ۳-۳۲: واکنش Real time PCR ژن Sox2	۱۲۷
شکل ۳-۳۳: منحنی ذوب واکنش Real time PCR ژن Sox2	۱۲۷
شکل ۳-۳۴: ژل آگارز محصول PCR	۱۳۰

### فهرست جدول‌ها

جدول ۱-۱: فازهای قاعدگی	۹
جدول ۱-۲: ساخت Master Mix cDNA	۸۱
جدول ۲-۲: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای واکنش Real time PCR	۸۴
جدول ۱-۳: تغییرات میانگین تعداد سلول‌های استرومای آندومتر رحم	۹۴
جدول ۲-۳: تغییرات مورفومتریکی قطر رحم در گروه‌های مورد مطالعه	۹۶
جدول ۳-۳: تغییرات وزن موش‌ها در گروه‌های مختلف مورد مطالعه بر حسب گرم وزن موش	۹۶
جدول ۳-۴: داده‌های چرخه نرمال آستانه (Ct) ژن‌های Oct4، Sox2 و ACTIN	۱۲۸
جدول ۳-۵: بررسی بیان نسبی ژن‌های Oct4 و Sox2 در گروه تیمار با ۱۷-بتا- استرادیول در مقایسه با گروه کنترل اواریکتومی	۱۲۸
جدول ۳-۶: بررسی بیان نسبی ژن‌های Oct4 و Sox2 در گروه تیمار با پروژسترون در مقایسه با گروه کنترل اواریکتومی	۱۲۸
جدول ۳-۷: بررسی بیان نسبی ژن‌های Oct4 و Sox2 در گروه تیمار با استرادیول- پروژسترون در مقایسه با گروه کنترل اواریکتومی	۱۲۸

### فهرست نمودارها

نمودار ۱-۳: تغییرات میانگین تعداد سلول‌های استرومای آندومتر رحم در گروه‌های مورد مطالعه	۹۵
نمودار ۲-۳: تغییرات مورفومتریکی قطر رحم در گروه‌های مورد مطالعه	۹۶
نمودار ۳-۳: نمودار میزان بیان ژن‌های Oct4 و Sox2 در گروه‌های مختلف تیمار با استرادیول، تیمار با پروژسترون و تیمار ترکیبی استرادیول- پروژسترون در مقایسه با گروه کنترل	۱۳۱

# فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته



## فصل ۱

### مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

#### ۱-۱ سلول‌های بنیادی

سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایز نیافته کمیابی هستند که می‌توانند بدون تمایز، خود تجدید<sup>۱</sup> شوند [۱]. این سلول‌ها در اندام‌ها و بافت‌های بالغ بسیاری وجود دارند و قادرند به دودمان‌های سلولی مختلف تمایز یابند. کمیاب بودن و عدم مشخصات مورفولوژیکی متمایزکننده و فقدان نشانگرهای خاص، شناسایی جایگاه آن‌ها را در بافت‌ها دشوار می‌کند [۲].<sup>۳</sup> با توجه به مرحله‌ی تکوین، سلول‌های بنیادی را می‌توان به سلول‌های بنیادی جنینی<sup>۲</sup> و سلول‌های بنیادی بالغ<sup>۳</sup> (سلول‌های بنیادی سوماتیک) طبقه‌بندی کرد [۱]. سلول‌های بنیادی بالغ با ویژگی‌های عملکردی شامل پتانسیل تکثیر بالا، ظرفیت خود تجدیدی قابل توجه و توانایی تمایز به حداقل یک نوع دودمان عملکردی بالغ، تعریف می‌شوند [۴-۷]. خودتجدیدی یا توانایی تولید سلول‌های بنیادی دختر یکسان برای حفظ منبع سلول‌های بنیادی در بافت‌ها ضروری است. تقسیم سلولی نامتقارن، مکانیسمی برای تولید یک سلول دختری یکسان و یک سلول دختری تمایز یافته‌تر است [۵]. سلول‌های بنیادی همچنین متحمل تقسیمات متقارن جهت تولید دو سلول بنیادی دختر یکسان یا پروژنیاتورهای سلول‌های تقویت‌کننده موقتی<sup>۴</sup> (سلول‌های موقتی با توان تمایزی بالا: TA) می‌شوند. زیگوت<sup>۵</sup> اولین گروه از دودمان سلول‌های بنیادی است و توتی‌پوتنت<sup>۶</sup> یا همه‌توان نامیده می‌شود که قادر است انواع سلول‌ها را در جنین و بافت‌های خارج جنینی تولید و تکوین رویان را حمایت کند [۷-۹]. سلول‌های بنیادی جنینی از توده‌ی سلول داخلی<sup>۷</sup> بلاستوسیست مشتق شده‌اند که پلوری‌پوتنت<sup>۸</sup> یا پرتوان نامیده می‌شود و به جنین تبدیل شده اما به بافت خارج جنینی (تروفوبلاست) تبدیل نمی‌شود. این

<sup>1</sup> Self-renewal

<sup>2</sup> Embryonic stem (ES) cells

<sup>3</sup> Adult stem cells = Somatic stem cells

<sup>4</sup> Transit amplifying (TA) cells

<sup>5</sup> Zygote

<sup>6</sup> Totipotent

<sup>7</sup> Inner cell mass

<sup>8</sup> Pluripotent

سلول‌ها قادرند به انواع سلول‌های سه لایه جنینی اکتودرم، مزودرم و اندودرم و نیز به تروفکتودرم<sup>۱</sup> تمایز یابند (شکل ۱-۱، A) (۲، ۸، ۱۰-۱۲). پتانسیل تمایزی این سلول‌ها به طور فزاینده‌ای به‌دنبال تکوین جنین محدود می‌شود [۷]. سلول‌های بنیادی بالغ<sup>۲</sup> که سلول‌های سوماتیک نیز نامیده می‌شوند به مقدار کم به عنوان سلول‌های تمایز نیافته در بیشتر بافت‌های بالغ وجود دارند. در سال‌های اخیر این سلول‌ها در انواع مختلفی از بافت‌ها و اندام‌ها توسط ویژگی‌های عملکردی خود شناسایی شده‌اند. این سلول‌ها توانایی خودتکثیری دارند و به یک یا چند دودمان سلولی با پتانسیل تکثیری بالا تمایز می‌یابند و سلول‌های بنیادی مولتی نامیده می‌شوند [۴-۶]. سلول‌های بنیادی سوماتیک در بافت‌های بالغ به سلول‌های سازنده هر بافت که در آنجا مستقرند تمایز می‌یابند به عنوان مثال سلول‌های بنیادی هموپوئیتیک<sup>۳</sup> را می‌توان نام برد [۱۳]، که توانایی خودتکثیری و تمایزی آن‌ها وابسته به فاز چرخه سلولی و ریزمحیط<sup>۴</sup> خاص می‌باشد. سلول‌های بنیادی الیگوپوتنت<sup>۵</sup> به انواع کمی سلول تمایز می‌یابند به عنوان مثال سلول‌های بنیادی میلوئیدی یا لنفوئیدی را می‌توان نام برد. پروژنیوتورها از سلول‌های بنیادی بالغ مشتق می‌شوند که به یک مسیر تمایزی ویژه متعهد شده و توانایی خودتجدیدی آن‌ها محدود است و سلول‌های بنیادی یونی پوتنت<sup>۶</sup> نامیده می‌شوند. سلول‌های بنیادی خاص بافتی ممکن است به عنوان پروژنیوتورها در نظر گرفته شوند [۱۴-۱۶]. به نظر می‌رسد سلول‌های بنیادی و سلول‌های پروژنیوتور، سلول‌های مشابه با فنوتیپ متفاوت و تحت شرایط مختلف هستند [۱۷]. سلول‌های بنیادی یونی پوتنت توانایی تمایز به یک نوع سلول منفرد کاملاً بالغ را دارند. به عنوان مثال می‌توان سلول بنیادی زایای<sup>۷</sup> بیضه را نام برد که اسپرم تولید می‌کند [۱۸]. سلول‌های بنیادی متحمل تقسیمات سلولی نامتقارن می‌شوند و سلول‌های دختری به طور متفاوتی به سوی تبدیل شدن به سلول‌های بنیادی خود تکثیر یا سلول‌های TA هدایت می‌شوند. سلول‌های TA دارای ویژگی‌های حدواسط بین سلول‌های بنیادی و سلول‌های تمایز یافته نهایی‌اند، بطوری‌که پتانسیل تکثیری این سلول‌ها محدود شده، آن‌ها متحمل چند دوره تقسیم سلولی می‌شوند و بتدریج نشانگرهای تمایزی را به منظور تولید سلول‌های تمایز یافته نهایی<sup>۸</sup> بدست می‌آورند و توانایی خود تجدیدی را از دست می‌دهند [۴، ۱۹]. سلول‌های TA به سرعت تکثیر یافته و در نهایت به سمت سلول‌های مؤثر تمایز یافته نهایی<sup>۹</sup> تمایز می‌یابند (شکل ۱-۱، B). سلول‌های بنیادی بالغ مختلف با توانایی تمایز به انواع سلول‌های خاص

<sup>1</sup> Trophectoderm

<sup>2</sup> Adult stem cells

<sup>3</sup> Haemopoietic stem cell (HSC)

<sup>4</sup> Microenvironment

<sup>5</sup> Oligopotent

<sup>6</sup> Unipotential stem cells

<sup>7</sup> Germ stem cell

<sup>8</sup> Cellular amplification process producing numerous terminally differentiated cells

<sup>9</sup> Terminally differentiated effector cells

مثل سلول‌های بنیادی عصبی<sup>۱</sup>، گوارش<sup>۲</sup>، خونی<sup>۳</sup>، مزانشیمی و کریپت<sup>۴</sup> شناسایی شده اند (شکل ۱-۱، A). سلول‌های استرومایی مولتی پوتنت مزانشیمی<sup>۵</sup> که در بافت‌های مختلف انسانی وجود دارند به عنوان سلول‌های چسبنده به پلاستیک با فنوتیپ سطحی مخصوص به خود قادرند به استئوبلاست‌ها، آدیپوسیت‌ها و کندروسیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی<sup>۶</sup> تمایز یابند [۲۰، ۲۱]. سلول‌های بنیادی جنینی را برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ از موش و سپس در سال ۱۹۹۸ از بلاستوسیست‌های انسانی جداسازی نمودند [۹، ۲۲]. اگرچه استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی از نظر اخلاقی منع شده است و احتمال تشکیل تومور در آن‌ها زیاد است، تحقیقات بر روی سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان داده است که این سلول‌ها برای درمان زخم [۲۳-۲۵]، ترمیم سطح دوپامین مغز در مدل موش پارکینسونی [۲۶]، افزایش سطح گلوکز خون [۲۷]، درمان آسیب‌های نخاعی [۲۸-۳۰]، و بیماری‌های دیگر [۳۱-۳۷] کاربرد دارند. با تزریق سلول‌های بنیادی جنینی به فرد دیگر، این سلول‌ها می‌توانند به سلول‌های مختلف تمایز یابند و ممکن است باعث تشکیل تومور<sup>۷</sup> شوند. سلول‌های بنیادی استرومایی مولتی پوتنت را از سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان به دست می‌آورند. اما این سلول‌ها به شدت تهاجمی هستند که باعث محدودیت استفاده از این سلول‌ها در تحقیقات می‌شود. برای رفع این مشکل می‌توان از سلول‌های بنیادی خون قاعدگی که تکثیرپذیری بالایی دارند استفاده نمود [۱]. سلول‌های بنیادی استرومایی مولتی پوتنت آندومتر پتانسیل تمایزی خود را حفظ می‌کنند [۳۸]. مطالعات بر روی حیوانات نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی آندومتر انسان می‌توانند چندین نوع از سلول‌های آسیب دیده را در شرایط آزمایشگاهی ترمیم کنند. در سال ۲۰۰۴ برای اولین بار Gargett توانست سلول‌های بنیادی آندومتر انسان را مستقیماً از آندومتر بدست آورد [۳۹].

---

<sup>1</sup> Neural

<sup>2</sup> Bulge

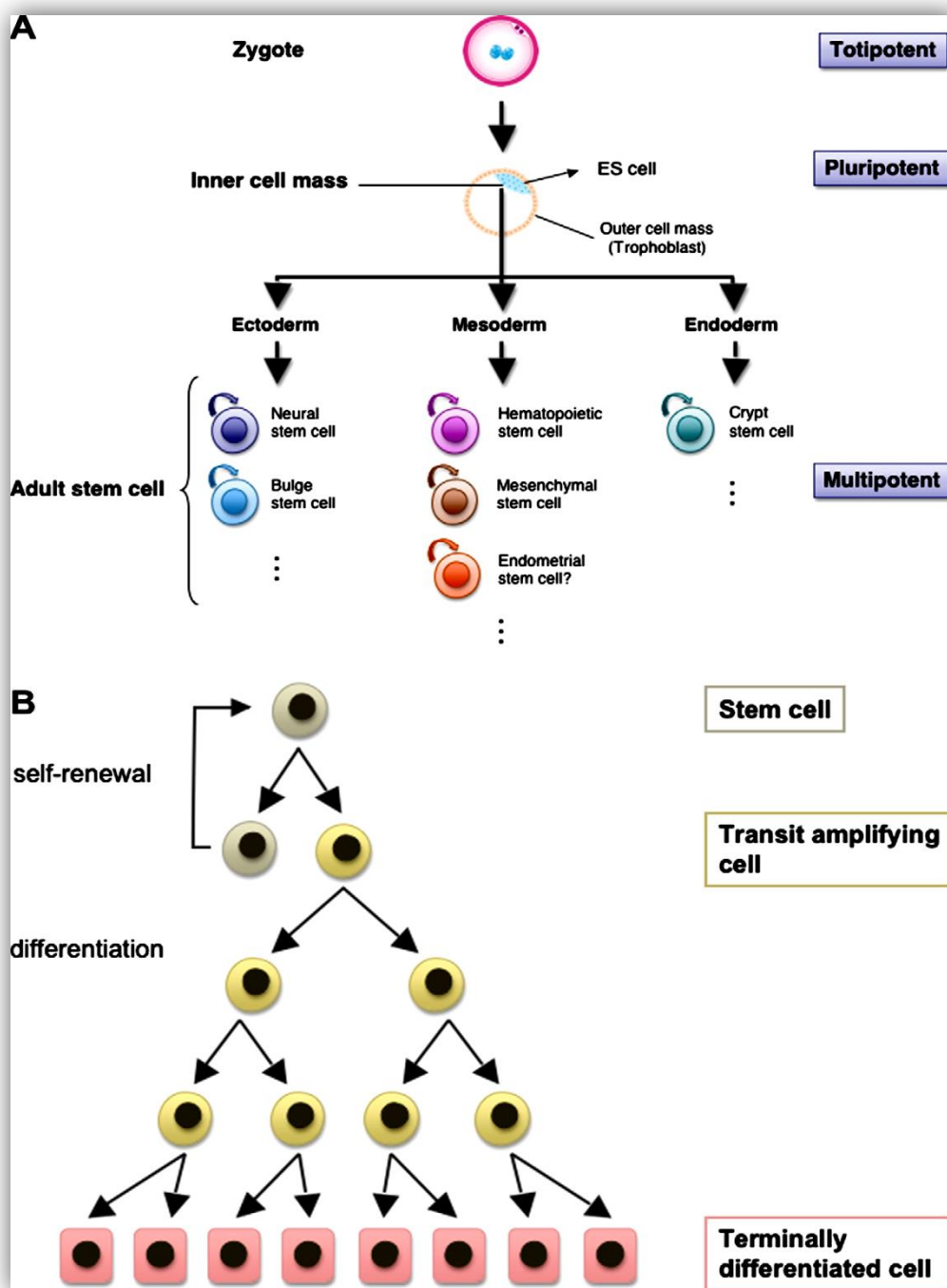
<sup>3</sup> Hematopoietic

<sup>4</sup> Crypt

<sup>5</sup> MSCs

<sup>6</sup> *In vitro*

<sup>7</sup> Teratoma



شکل ۱-۱: رده بندی سلول‌های بنیادی [۱۶].  
 A: رده بندی تکوینی، B: رده بندی سلول‌های بنیادی بالغ