بسم الله الرحمن الرحیم

مدیریت تحصیلات تکمیلی
دانشکده دامپزشکی
گروه گروه پاتوبیولوژی

پایان نامه جهت اخذ دکتری حرفه ای در رشته دامپزشکی

اثر نانومولسیون کافئین بر اسیب ناشی از تیواستامید در بافت بیضه خرگوش سفید نیوزلندی

استاد راهنما:
دکتر عباس جمشیدیان-دکتر محمدرضا حاجی نژاد

اساتید مشاور:
دکتر عباس رهدار-دکتر محمد ابراهیم اکبری

تهیه و تدوین:
مصطفی محمدی

تابستان 1400

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

به پاس قدردانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از سلامت و امنیت و آرامش و آسایش برای من فراهم آورد.

تقدیم به

همه کسانی که لحظه ای بعد انسانی و وجدانی خود را فراموش نمی کنند و بر آستان گران سنگ انسانیت سر فرود می آورند و انسان را با همه تفاوت هایش ارج می نهند.

سپاسگزاری

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. و سلام و درود بر محمّد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است.

بدون شک جایگاه و منزلت معلم، اجلّ از آن است که در مقام قدردانی از زحمات بی شائبه ی او، با زبان قاصر و دست ناتوان، چیزی بنگاریم. اما از آنجایی که تجلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تامین می کند و سلامت امانت هایی را که به دستش سپرده اند، تضمین؛ بر حسب وظیفه و از باب "من لم یشکر المنعم من المخلوقین لم یشکر اللهِ عزّ و جلّ":

از استاد با کمالات و شایسته؛ دکتر..... و دکتر..... که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند؛

باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

چکیده

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

1-1- مقدمه: 2
1-2- ضرورت انجام تحقیق 4
1-3- فرضیات تحقیق 5
1-4- اهداف تحقیق 5

فصل دوم: کلیات و بررسی منابع

2-1- کلیات 7
2-1-1- نانوامولسیون 7
2-1-1-1- نحوه آماده سازی نانو امولسیون 7
2-1-1-2- مزایا و موارد استفاده نانوامولسیون ها 9
2-1-2- کافیین 10
2-1-2-1- مصرف کاکائو و خطر افزایش بیماری قلبی عروقی 11
2-1-2-2- مصرف قهوه و اثر آن بر خطر ابتلا به بیماری های قلبی – عروقی 12
2-1-2-3- اثر سوء قهوه بر سیستم قلبی-عروقی 12
2-1-2-4- کافئین و افزایش هورمونهای استرس زا: 13
2-1-2-5- کافئین و تداخل در متابولیسم GABA 14
2-1-2-6- مکانیسم های عمل کافئین در سطح اندوتلیال: 14
2-1-2-7- مکانیسم کافئین روی سلول های عضلانی 15
2-1-2-8- کافئین و کانال های رایانیدین: 15
2-1-2-9- دیگر مکانیزم های مستقیم: 16
2-1-2-10- کافئین و کانال های رایانیدین: 16
2-1-2-11- اثر کافئین در دوران بارداری: 18
2-1-3- بافت بیضه 19
2-1-3-1- دستگاه تولیدمثل موش صحرایی نر 19
2-1-3-2- بیضه‌ها 19
2-1-3-3- لوله‌های منی ساز 21
2-1-3-4- سلول‌های سرتولی 22
2-1-3-5- اعمال سلول‌های سرتولی 22
2-1-3-6- سلول‌های دودمان اسپرماتوژن 23

7-3-1-2- اسپرماتوژنز 23
8-3-1-2- ساختار اسپرم بالغ موش صحرایی 24
9-3-1-2- بافت بینابینی بیضه 24
10-3-1-2- مجاری تناسلی 24
11-3-1-2- آلت تناسلی 25
12-3-1-2- غدد ضمیمه دستگاه تولیدمثل 26
4-1-2- تیو استامید 26
1-4-1-2- تیواستامید و ویژگی های آن 26
5-1-2- استرس اکسیداتیو 27
2-2- بررسی منابع 31

فصل سوم: مواد و روش ها

1-3- نمونه آماری 35
2-3- روش تهیه سرم 35
3-3- تست های آزمایشگاهی بر روی نمونه سرم خون 35
4-3- اندازه گیری فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی: 35
5-3- پروتکل اندازه گیری کاتالاز 36
6-3- پروتکل اندازه گیری سوپر اکسید دیسموتاز 36
3-6-1- روش انجام آزمایش 36
7-3- اندازه گیری مالون دی آلدئید سرم 37

فصل چهارم: نتایج و بحث

1-4- نتایج 40
1-1-4- نتایج سنجش کاتالاز (CAT) در سرم 40
2-1-4- نتایج سنجش سوپر اکسید دیس موتاز (SOD) در سرم 49
3-1-4- نتایج سنجش مالون دی آلدئید (MDA) در سرم 59
2-4- بحث 73
نتیجه گیری: 77
پیشنهادات 77
منابع 78

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل 1-2- ساختار تیواستامید 27
شکل 1-4- نتایج سنجش کاتالاز سرم در خرگوش سفید نیوزلندی 41
شکل 2-4- نتایج سنجش سوپر اکسید دیس موتاز سرم در خرگوش سفید نیوزلندی 51
شکل 3-4- نتایج سنجش مالون دی آلدئید سرم در خرگوش سفید نیوزلندی 60

فصل اول

مقدمه

1-1- مقدمه:

ناباروری یکی از مشکلات رایجی است که امروزه موردتوجه و بررسی دانشمندان مراکز تحقیقاتی و بالینی قرارگرفته است. میزان ناباروری در جهان از سال 1995 تاکنون 50 درصد افزایش داشته است. تحقیقات انجام‌شده در کشور نشان می‌دهند. 50 درصد از این مشکلات، مربوط به نقص در سیستم تولیدمثل مردان است و درصدی از این مشکلات مربوط به مردانی است که آستنواسپرمی دارند (Ghahremani, 2005). امروزه در سراسر جهان قهوه و چای به‌عنوان نوشیدنی اصلی مردم جایگاه خود را دارا است. مصرف یک فنجان قهوه 100 تا 150 میلی‌گرم کافئین و یک فنجان چای حدود 30 تا 50 میلی‌گرم کافئین دارد (Karmon *et al*., 2017; Galeone *al*., 2008). در انسان 75 درصد کافئین پلاسما وارد شیر می شود (Qi *et al*., 2014; Karmon *et al*., 2017). در موش، 2 درصد کافئین مصرفی تو سط مادر از طریق شیر به نوزادان می‌رسد به‌طوری‌که بسته به میزان مصرف، در هر میلی‌لیتر از شیر موش 0/7 تا 7 میکرولیتر کافئین یافت می‌شود (Rivkees and Wendler, 2011). نوشیدن قهوه بیش از ۲ فنجان (بیش از 200 میلی‌گرم کافئین) در روز اثرات نامطلوبی برای بارداری دارد. مکانیسم‌های فیزیولوژیکی وجود دارد که از طریق آن‌ها کافئین موجود در قهوه ممکن است به جنین آسیب برساند. مطالعات نشان دادند زنان بارداری که روزانه دو فنجان قهوه می‌نوشند احتمال این که نوزاد زیر وزن طبیعی به دنیا بیاورند بیش‌تر است .آزمایشات نشان می‌دهد که کافئین همراه با ریزمغذی‌ها و اکسیژن، آزادانه از جفت عبور کرده و به جنین در حال رشد می‌رسد اما جنین فاقد آنزیم‌های موردنیاز برای غیرفعال سازی اثرات کافئین است (Bech *et al*., 2005; Zappettini *et al*., 2019; Paiva *et al*., 2019; Voerman *et al*., 2019). تغییرات هیستوپاتولوژیک در پی مصرف کافئین در برخی از اعضاء بدن ازجمله مغز، قلب، کبد، کلیه، دستگاه گوارش و بیضه موردمطالعه قرارگرفته است (Vik *et al*., 2003; Leite *et al*., 2011; Park *et al*., 2015; Rauh *et al*., 2006). هم‌چنین مطالعات نشان

دادند که عوارض جانبی کافئین به فاکتورهای زیادی ازجمله دوز مصـرف بسـتگی دارد. به‌علاوه در مطالعات مشابه انجام‌شده، ازجمله مطالعه Belali و همکاران (2019) و Dorostghoal و همکاران (2011) بر روند تغییرات اندازه بیضـه نشـان می‌دهد که باوجود پایان دوره قرارگیری در معرض کافئین، اثرات آن همچنان بر بافت بیضـه ادامه دارد. این بدان معنی اسـت که قرارگیری در معرض کافئین طی دوره شـیرخوارگی می‌تواند موجب بروز تغییرات برگشـت‌ناپذیر بر روی کارآیی اسپرماتوژنز شود، به‌طوری‌که در هنگام بلوغ این اثرات همچنان ادامه دارد. البته با طولانی‌تر نمودن طول دوره مطالعه، دقیق‌تر می‌توان برگشـت‌پذیر بودن اثرات کافئین را بهتر موردمطالعه قرارداد (Dorostghoal *et al*., 2012). در منابع علمی، از امولسـیونی با ذرات ریز در حدود 100 نانومتر تحت عنوان نانوامولسـیون یاد می‌کنند. نانوامولسـیون اسـانس به‌عنوان ترکیب ضـدمیکروب خوب مطرح می‌باشـد. این ویژگی به خاطر کاهش اندازه ذرات و افزایش سـطح تماس اسـانس با باکتری است (Bech *et al*., 2005; Voerman *et al*., 2019).

یافته‌ها نشـان می‌دهد که آنتی‌اکسـیدان‌های غیر آنزیمی نقش مهمی در تکوین سـیسـتم تولیدمثلی انسـان و باروری دارند. از میان آن‌ها، روی به‌عنوان یک ماده معدنی و آنتی‌اکسـیدان غیر آنزیمی، می‌تواند به‌عنوان عامل کمکی (Cofactor) بیش از ۳۰۰متالوآنزیم شـرکت‌کننده در متابولیسم پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، رونویسی DNA و سنتز پروتئین عمل کند (Klotz, 2000).

تیواستامید یک ماده شیمیایی است که به‌طورمعمول به‌عنوان کشنده قارچ‌ها و یک سم قوی کبدی به کار می‌رود. تیواستامید یک سوبسـترای نفروتوکسـیک قـوی اسـت و باعـث ایجـاد اخـتلال در عملکرد لیپیدی می‌گردد. تیواستامید توسط سیسـتم اکسـیداز بـه متابولیت‌های سمی‌اش Sulfene متابولیزه می‌شود که سپس در میان چندین اندام ازجمله پلاسما، کبـد، کلیـه، مغـز اسـتخوان، آدرنـال و دیگر بافت‌ها پخش می‌شود. تیواسـتامید تحـت یـک متابولیسـم گسترده

به اســتات تبــدیل می‌شود و از طریــق ادرار در دوره 24 ساعته دفع می‌گردد (Kuramochi *et al.*, 2016). تیواستامید یک ترکیب ارگانوســـولفور اســـت و یکی از چندعاملی است که تولید نکروز سنتری لوبـــولار در کبـــد می‌کند (Koblihová *et al.*, 2014) . اثرات تیواستامید محدود به کبد نمی‌باشد بلکــه ممکــن است به دیگر بافــت‌هــا نیــز توســعه یابــد و تغییــرات عملکــردی و ساختاری فراوانی در تیموس، کلیه‌ها، روده، طحال و ریه‌ها ایجاد کند (Koblihová *et al.*, 2014; Saleh *et al.*, 2014)

علی‌رغم مطالعات قبلی در مورد اثر حفاظتی کافیین بر آســـیب برخی بافت‌ها، درباره تأثیر نانومولسیون کافیین بر آسیب بافت بیضه اطلاعاتی وجود ندارد. لذا مطالعه حاضر باهدف روشن ساختن اثر نانومولسیون کافیین بر آسیب بافت بیضه موردبررسی قرار خواهد گرفت.

2-1- ضرورت انجام تحقیق

کافئین محرک سیستم اعصاب مرکزی، عضلات قلب و سیستم تنفسی است، کمی دیورتیک بوده و خستگی را به تعویق می‌اندازد. قابل‌توجه‌ترین اثرات کافئین در قسمت دستگاه عصبی مرکزی اســـت. کافئین عملکرد خود را از طریق بلوک کردن گیرنده آدنوزین در مغز و ســـایر ارگان‌ها انجام می‌دهد و این مهم‌ترین مکانیسم عملکرد آن است. این توانایی کافئین در غلظت‌های پایین آن (بعد از مصــرف یک فنجان قهوه) نیز قابل‌مشــاهده اســت (Partosch *et al.*, 2015). در ســال‌های اخیر توجهات زیادی به مصرف کافئین و اثرات آن بر دستگاه‌های مختلف شده است. با توجه به ناشناخته بودن مکانیسم کامل اثر کافئین بر غده سمینال وزیکول و اپیدیدیم دستگاه تناسلی نر و کم بودن مطالعات در این زمینه هدف از مطالعه حاضر شناخت بیش‌تر اثرات و مکانیسم اثر نانومولسیون کافئین و آسیب ناشی از استامید بر بافت بیضه خرگوش می‌باشد.

3-1- فرضیات تحقیق

1- نانوامولسیون کافیین اثر حفاظتی بر روی آسیب بافت بیضه ناشی از تیو استامید دارد.

2- نانوامولسیون کافیین کاهش غلظت مالون دی آلدئید کبد را در رت های دچار آسیب بافت بیضه کاهش می‌دهد.

3- نانوامولسیون کافیین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز را در رت های دچار آسیب بافت بیضه افزایش می‌دهد.

4- نانوامولسیون کافیین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان سوپر اکسید دیس موتاز را در رت های دچار آسیب بافت بیضه افزایش می‌دهد.

4-1- اهداف تحقیق

1- بررسی اثر حفاظتی نانوامولسیون کافیین بر روی آسیب بافت بیضه ناشی از تیواستامید

2- بررسی اثرات آنتی اکسیدانی نانوامولسیون کافیین

3- کمک به شناسایی دارو جهت درمان آسیب بافت بیضه

فصل دوم

کلیات و بررسی منابع

1-2- کلیات

1-1-2- نانوامولسیون

نانو نانوامول سیون ها امول سیون هایی می‌با شند که اندازه ی قطره ی آنها به میزان 100نانومتر می‌با شد. یک نانوامول‌سیون معمولی شامل روغن، آب و ماده ی امول‌سیون کننده می‌با شد . ا ضافه کردن یک ماده امولســـیون کننده برای بوجود آوردن قطراتی با اندازه ی کوچک مهم و بحرانی می‌باشد بدلیل اینکه کشش بین سطحی، یعنی، انرژی سطح را به ازای هر واحد سطح، را بین فاز های آب و روغن امول سیون کم می‌کند (Anton and Vandamme, 2011). ماده امول سیون کننده می‌تواند در پایدار نمودن نانوامولســـیون ها نقش داشـــته که این امر از روش میان کنش های الکتروستاتیک دافعه و بوجود اوردن ممانعت فضایی صورت می‌پذیرد (Mcclements, 2015). ماده ی امولسیون کننده که بصورت معمول به کار برده می‌شود سورفاکتانت می‌باشد، ولی پروتئین ها و لیپید ها نیز در آماده ســـازی نانوامولســـیون ها بطور کارآمدی هســـتند(Silva *et al*., 2012). نانوامولسیون های به لحاظ کینتیکی پایدار می‌باشند، بدین معنی که با دادن مدت زمان کافی، یک فاز نانوامولسیون تفکیک می گردد (Jafari *et al*., 2007).

1-1-1-2- نحوه آماده سازی نانو امولسیون

در سامانه‌های امول سیونی کاربردهایی از قبیل پایداری، رئولوژی، ظاهر، رنگ و بافت با توجه به اندازه قطرات امول‌سیون و توزیع اندازه قطره‌ها می‌با شد. و از طرفی، ویژگیهای امول‌سیون‌ها وابسته به نوع تکنیکی برای تهیه امولسیون و شرایط فرایند امولسیون‌سازی هستند مورد استفاده قرار می گیرند. تکنیک‌های متفاوتی جهت تولید نانوامولســـیون‌ها موجود اســـت که هر کدام دارای مزایا و عیوبی هستند و منجر به تولید نانوامول‌سیون‌هایی با خصو صیات متفاوت می شوند (Gutiérrez *et al*., 2008).

با توجه به مطالب فوق نانوامولسیون‌ها سامانه‌های غیرتعادلی می‌باشند که تشکیل انها به‌صورت خودبه‌خودی نمی‌باشد. لذا، اعمال نوعی انرژی، عموماً انرژی حاصل از تجهیزات مکانیکی یا انرژی شیمیایی حاصل از اجزا و ترکیبات، جهت شکلگیری آن‌ها مورد نیاز می‌باشد. در ضمن، خصوصیات نانوامولسیون‌ها به غیر از آنکه به تغییرات ترکیبات آن‌ها بستگی داشته بلکه به روش تهیه آن‌ها نیز وابسته است. از اینرو، بهینه‌سازی خصوصیات نانوامولسیون‌ها از راه بهینه نمودن متغیرهای مربوط به ترکیبات و نیز متغیرهای مربوط به روش و شرایط تهیه آن‌ها ممکن می‌باشد. هدف‌های عمده و نهایی در بهینه‌سازی خصوصیات نانوامولسیون‌ها غالباً رسیدن به حداقل اندازه قطرات، حداقل بس‌پاشیدگی[1] و بیشترین پایداری می‌باشد (McClements, 2015).

تولید نانوامولسیون‌ها معمولاً به دو روش ممکن می‌باشد: امولسیون سازی با انرژی کم (فرایند میکروامولسیون‌سازی) و امولسیون‌سازی با انرژی زیاد. در شیوه نخست، نانوامولسیون‌ها یا اصطلاحاً «میکروامولسیون‌ها» حاصل از انتقال‌های فازی بوجود آمده طی فرایند امولسیون سازی که معمولا در دمای ثابت و تغییر ساختار یا در ساختار ثابت و تغییر دما اتفاق می‌افتند، به دست می‌آیند. امولسیون سازی غشایی، خودبه‌خودی، جانشین سازی حلال، معکوس شدن امولسیون و معکوس شدن فاز از جمله روش‌های مرسوم برای تولید «میکروامولسیون‌ها» یا همان نانوامولسیون‌ها با انرژی پایین هستند که به‌رغم مزیت‌های فراوان، دارای محدودیت‌هایی از جمله نیاز به مقدار زیاد مواد فعال سطحی (سورفاکتانت) و لزوم انتخاب دقیق مواد فعال سطحی و کوسورفاکتانت ها ستند(Tadros *et al.*, 2004). روش دوم، به‌دلیل کنترل توزیع اندازه قطرات امولسیون و قابلیت تولید امولسیون‌هایی مناسب و با تنوع زیاد، قابلیت کاربرد صنعتی بیشتری دارد و تهیه نانوامولسیون‌ها به روش امولسیون‌سازی با انرژی بالا با استفاده از تجهیزات مکانیکی از جمله

[1] Polydispersity

آسیاب‌های کلوئیدی، همگن‌سازهای با سرعت یا فشار بالا و همگن‌سازهای فراصوت ممکن است. در این میان، همگن‌سازهای فراصوت کارایی بیشتری جهت پایین اوردن اندازه قطرات و رسیدن به حداقل بس‌پاشیدگی و درنتیجه پایداری بیشتر نانوامولسیون می باشند (Jafari *et al.*, 2007).

2-1-1-2- مزایا و موارد استفاده نانوامولسیون ها

کوچک بودن اندازه قطرات و خصوصیات خاص نانوامولسیون‌ها در مقایسه با امولسیون‌های معمولی کاربردهایی جهت استفاده از آن‌ها در بسیاری از فناوری‌های کاربردی محسوب می‌گردد. در ضمن، طولانی بودن دوره پایداری فیزیکی، نانوامولسیون‌ها را گونه‌ی معمولی آن متفاوت می‌سازد و آن‌ها اغلب «به پایداری ترمودینامیکی رسیده» لقب داده می شوند (Tadros *et al.*, 2004). بیش از حد کوچک بودن اندازه قطرات نانوامولسیون‌ها نیز سبب می‌گردد در طول نگهداری پدیده‌های خامه‌ای شدن و تشکیل رسوب منجر می‌گردد، چون کوچک بودن قطرات مانع به هم پیوستگی و فلوکه شدن سطحی میگردد. از طرفی، به‌دلیل کوچک بودن قطرات، نانوامولسیون‌ها سطح ویژه زیادی داشته و از اینرو قابلیت نفوذ بالایی داشته که این خصوصیت آن‌ها را به یک سامانه انتقالی مؤثر تبدیل نموده است. از طرفی، برخلاف میکروامولسیون‌ها که به غلظت بالایی از سورفاکتانت نیازمندند، نانوامولسیون‌ها با وجود غلظت پایینتری از این مواد تشکیل می گردند (Troncoso *et al.*, 2012) . تولید نانوامولسیون جهت ریزپوشینه سازی و کنترل رهایش ترکیبات فراسودمند - ازقبیل انواع داروها، رنگ‌ها، اسانس‌ها، و ویتامین‌ها - یکی از زمینه‌های کاربردی فناوری نانو در صنایع غذایی می‌باشد. کاربرد اصلی نانوامولسیون‌ها آماده‌سازی نانوپراکنده‌ها توسط یک تک‌پار (منومر) قابل بسپارش (پلیمریزه شدن) می‌باشد که به‌عنوان فاز پراکنده مورد عمل قرار می‌گیرد و قطرات نانوامولسیون در حقیقت به‌عنوان یک نانوراکتور عمل می‌نماید. از کاربردهای سامانه‌های نانوامولسیونی در صنایع غذایی می‌توان به نقش آن‌ها در فرمولاسیون مواد غذایی و نوشیدنی‌های دارای ترکیبات فراسودمند پوشینه‌دارشده از قبیل کوآنزیم Q_{10}، لیکوپن، لوتئین،

بتا-کاروتن، ا سیدهای چرب امگا-۳، ویتامین‌های A و E، فیتوا سترول‌ها و ایزوفلاون‌ها ا شاره نمود (McClements, 2015).

2-1-2- کافیین

کافئین (Caffeine) یک ماده شیمیایی (۱، ۳، ۷- تری متیل گزانتین) و خوراکی ا ست که در برخی غذاها از جمله قهوه، کاکائو، کولا، چای، شکلات و برخی نوشیدنیها یافت می شود و همچنین نوعی داروی محرک اســت که می تواند از خوابیدن جلوگیری کند. کافئین یک آلکالوئید از خانواده متیل گزانتین ها ا ست که دارای خواصی مشابه با تئوفیلین و تئوبرومین می باشد. کافئین خالص، به صورت پودر سفید رنگ و تلخ می باشد. این ماده از ترکیب کربن، هیدروژن، نیتروژن و اکسیژن تشکیل شده است (Adebayo *et al*., 2007) کافئین پرمصرف ترین ماده دارویی در میان انسان ها به شمار می رود که تقریبا ۹۰ درصد انسانها به طور روزانه از آن استفاده می کنند. به عنوان مثال، یک آمریکایی به طور متوســط روزانه ۲۰۰ میلی گرم کافئین مصــرف می کند (Cooper *et al*., 1992). همچنین مصــرف کافئین در کشــورهای جهان ســوم، به دلیل تغییرات در فرهنگ، رو به افزایش اســت (Adebayo *et al*., 2007). مطالعات مختلف نشــان داده اند که کافئین واکنش های مختلفی در طیف گســترده ای از ســیســتم های بیولوژیکی بدن دارد (Dews, 1982)، از جمله تحریک ســیســتم عصــبی مرکزی و عضــله قلب، افزایش برونده ادراری، و ســســت شــدن عضــلات (Yukawa *et al*., 2004). همچنین گزارش شــده اســت که مصــرف کافئین باعث افزایش ســطح کلســیم ادرار و همچنین منجر به ضــربان نامنظم قلب خواهد شــد (Massey, 1998; Lynn and Kissinger, 1992). اثرات سمی کافئین روی بیماریهای قلبی و عروقی هنوز مورد بحث و پژوهش اســت. گرچه مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که دوز متوســط کافئین مضــر نمی‌باشــند (Mostofsky *et al*., 2012; Einother and Giesbrecht, 2013; Kim *et al*., 2012)، اما گزارشاتی

نیز وجود دارد که مصـرف بیش از حد کافئین مضـر اسـت (Di Rocco *et al*., 2011; McGee, 1980) در مجموع مطالعات نشـان داد که سـمیت کافئین بسـتگی به فارماکوکینتیک و تغییرات فارماکودینامیک، وضعیت بالینی و دوز مصرف دارد. مصرف خوراکی ها و نوشدنی ها حاوی کافئین از جمله شـکلات، چای و قهوه در ایران بسـیار زیاد می باشـد. با توجه به اینکه اثرات کافئین کاملا شناخته شده نمی باشد و همچنان مورد بحث و بررسی توسط محققان می باشد. هدف از تحقیق حاضـر مطالعه و بررسـی اثرات کافئین روی خطر ابتلا به بیماریهای قلبی عروقی و گزارش نتایج تحقیقات انجام شده در این راستا می باشد.

1-2-1-2- مصرف کاکائو و خطر افزایش بیماری قلبی عروقی

دانه های کاکائو و فراورده های تهیه شده از آن، مانند شکلات، شامل انواع مختلف از ترکیبات فیزیولوژیکی فعال از جمله پلی فنول که دارای اثرات مثبتی روی بیماری های قلبی-عروقی می باشـد و متیل گزانتین می باشـد (Huxley and Neil, 2003; Risner, 2008; McShea *et al*., 2008). به طور کلی، تئوبرومین (متیل گزانتین اصـلی در شـکلات)، یک محرک قلبی، ادرار آور، گشادکننده عروق کرونر و سست کننده عضلانی می باشد (Huxley and Neil, 2003; Risner, 2008). مطالعات متعددی نشـان میدهد که رژیم غذایی غنی از پلی فنول ها باعث کاهش فشـار خون خواهد شـد (Manach *et al*., 2005). نتایج مطالعات نشـان می دهند که مردان با مصـرف معمول ۱۰ گرم در روز از شکلات تلخ در مقایسه با مردانی که مصرف کم و یا صفر داشتند، فشار خون پایین تری را دارا بودند. در یک گروه بزرگ از مردان و زنان میانسـال آلمانی (تعداد ۱۹۳۵۷) که مصرف بالای شکلات داشتند (۵/۷ میلی گرم در رزو)، هم فشار خون سیستولی و هم دیاستولی در آنها نسبت به افراد شاهد کمتر بود (Buijsse *et al*., 2010).

2-2-1-2- مصرف قهوه و اثر آن بر خطر ابتلا به بیماری های قلبی – عروقی

قهوه به همراه چای، نو شیدنی پر م صرف در سرا سر جهان می با شد. اثر بالقوه م صرف آن بر بیماری های قلبی عروقی هنوز مورد بحث اســت. قهوه منبع اصــلی کافئین می باشــد ولی حاوی ترکیبات دیگری از جمله فنول، ویتامین B3 ، منیزیم، پتاســیم و فیبر اســت که ممکن اســت هم اثرات مفید و هم م ضر بر روی سی ستم قلبی و عروقی دا شته با شد (Spiller, 1998). ۳. برخی از مطالعات نشــان داده اســت که مصــرف قهوه اثرات ســوء بر نشــانگرهای بیولوژیکی مختلف بیماری عروق کرونر قلب دارد که از جمله آن می توان به کل سترول خون (Jee *et al*., 2001)، ف شار خون (Noordzij *et al*., 2005)، پایداری انســولین (Keijzers *et al*., 2002) و هموســیســتئین پلاســما (Urgert *et al*., 2000) ا شاره کرد. بر ا ساس پژوهش های صورت گرفته م صرف کافئین منجر به کاهش قابل توجهی در حسا سیت به انسولین (Keijzers *et al*., 2002) و افزایش در غلظت گلوکز (Battram *et al*., 2006)، غلظت اپی نفرین و ف شار خون خواهد شد (Robertson *et al*., 1981). در فردی که به صــورت معمولی قهوه اســتفاده می کند در عرض یک هفته پس از شــروع مصــرف کافئین، تر شح اپی نفرین و ف شار خون تحت تأثیر قرار خواهد گرفت (Robertson *et al*., 1981). در ارتباط با فشار خون، یک افزایش نسبتا کم پس از چند هفته باقی می ماند (Noordzij *et al*., 2005). در ادامه تحریک کافئین روی تر شح اپی نفرین به نظر می ر سد که باعث پایداری انسولین خواهد شد (Keijzers *et al*., 2002). همچنین بر ا ساس مطالعات تایید شده ا ست که متابولیسم گلوکز نیز کاهش می یابد.

2-2-1-3- اثر سوء قهوه بر سیستم قلبی-عروقی

قهوه و افزایش فشار خون، مصرف کافئین زیاد از طریق نوشیدن قهوه به طور قابل توجهی باعث افزایش فشار خون مرکزی و نیز فشار خون سیستولیک و دیاستولیک خواهد شد (Waring *et al*., 2000; Jeong *et al*., 1990). نو شیدن قهوه، ظرف سه ساعت، باعث افزایش قابل اندازه گیری هم

در فشار خون سیستولیک و هم دیاستولیک، خواهد شد که حتی این مقدار تا روز بعد نیز باقی می ماند (Shirlow eong *et al*., 1988; James, 1994). در افراد مستعد ابتلا به فشار خون بالا، نو شیدن قهوه ممکن ا ست م ضر با شد (Nurminen *et al*., 1999) نو شیدن قهوه و نامنظم شدن ضربان قلب: نوشیدن قهوه منجر به بروز تپش قلب خواهد شد(Lochen and Rasmussen, 1996; Shirlow and Mathers,1985; Rosmarin, 1989). با توجه به اثرات آن در بالا بردن کورتیزول، ضربان قلب افزایش می یابد که به دنبال آن بی نظمی تپش قلب رخ خواهد داد (Rosmarin, 1989). قهوه و افزایش کلسترول خون: به طور کلی نوشیدن قهوه با سطوح بالای کلسترول در ارتباط می باشد به ویژه در افرادی که قهوه با دمای بالا استفاده می کنند (Lindahl *et al*., 1991; Salvaggio *et al*., 1991). همچنین انواع دیگر قهوه نیز باعث افزایش کلسترول می شوند و مطالعات نشان داده است که با جایگزینی قهوه های عادی با قهوه های فاقد کافئین، بر میزان کلسترول تأثیری ندارد (Aro *et al*., 1989; Green and Harari, 1992; van Dusseldorp *et al*., 1990)، همچنین بعضی از مطالعات نشان داده است که نوشیدن قهوه باعث افزایش مقدار لیپوپروتئین با چگالی کم خواهد شد (Kark *et al*., 1985) نوشیدن قهوه و افزایش سطح همو سیستئین: افزایش همو سیستئین پلا سما خطر ابتلای فرد به حمله قلبی را افزایش می دهد. نو شیدن قهوه به طور قابل توجهی باعث افزایش همو سیستئین در جریان خون می شود. این اثر منفی در هر دو نوع قهوه کافئین دار و بدون کافئین رخ می دهد و در عرض چند ساعت پس از مصرف قهوه رخ خواهد داد (Verhoef *et al*., 2002). همچنین نتایج نشان داد که فیلتر کردن قهوه نیز اثری بر روی افزایش هموسیستئین نخواهد داشت (Grubben *et al*., 2000).

4-2-1-2- کافئین و افزایش هورمون‌های استرس زا:

کافئین موجود در قهوه باعث افزایش هورمون کورتیزول، اپی نفرین و نوراپی نفرین خواهد شد (al'Absi *et al*., 1998). این اثرات تا ساعت ها پس از مصرف قهوه باقی خواهد ماند. این هورمون‌ها

مسئول افزایش ضربان قلب و فشار خون، و یک حس «هشدار اضطراری» می باشند. به دنبال آن گردش اکسیژن به مغز و اندام کاهش می یابد و سیستم ایمنی سرکوب می شود (Lovallo *et al.*, 1996).

5-2-1-2- کافئین و تداخل در متابولیسم GABA[1]

گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA)، یک انتقال دهنده عصبی است که به طور طبیعی در مغز و سیستم عصبی و همچنین قلب تولید می شود و نقش مهمی در خلق و خوی و مدیریت استرس و عملکرد ضربان قلب دارد. کافئین باعث تداخل در اتصال GABA به گیرنده های GABA می شود که از نقش آرام بخشی آن جلوگیری می کند (Roca *et al.*, 1998). نقش GABA در مدیریت استرس در حضور کافئین دچار چالش می شود که به دنبال این عوامل، خطر حملات قلبی افزایش می یابد (Rosengren *et al.*, 2004).

6-2-1-2- مکانیسم های عمل کافئین در سطح اندوتلیال:

اندوتلیوم احتمالا گسترده ترین بافت در بدن انسان است. به شکل یک مانع آناتومیک و کاربردی دیواره سرخرگ را پوشش میدهد و به شدت انتخابی عمل می کند و بسیار نفوذپذیر است. اندوتلیوم طیف گسترده ای از مواد وازواکتیو را تولید و ترشح می کند که این مواد نقش مهمی در تنظیم تن VSMC (Vascular Smooth Muscle Cell) از طریق تعامل بین مواد تنگ کننده عروق (مانند رنین، آنژیوتانسین، ET-1 و...) و مواد گشاد کننده عروق (مانند NO، برادی کینین، PgI2) دارد (Sudano and Spieker *et al.*, 2006; L´ opez *et al.*, 2001). کافئین به طور مستقیم روی سلول اندوتلیال تاثیر می گذارد و باعث تحریک تولید NO می شود (Umemura *et al.*, 2006). به طور خلاصه، اثر کافئین بر اندوتلیوم عروق بیشتر در ارتباط با تولید NO می باشد (Rosenberg

[1] Gamma-aminobutyric acid

et al., 1988) که دارای اثر اتوکرین است و باعث افزایش غلظت کلسیم در اندوتلیوم خواهد شد و به سرعت از سلول اندوتلیوم خارج می شود (Shin *et al*., 1996).

2-1-2-7- مکانیسم کافئین روی سلول های عضلانی

کافئین ممکن است مکانیسم های عروق را از طریق اثرات مستقیم یا غیرمستقیم بر VSMC تحت تأثیر قرار دهد اثرات مستقیم: کافئین با تأثیر روی VSMC، باعث ایجاد حداقل انقباض اولیه می شود و پس از آن اثر قابل توجهی روی ماده گشاد کننده عروق دارد. با کمک مکانیسم های مختلف این اثرات قابل توضیح می باشد.

2-1-2-8- کافئین و کانال های رایانیدین:

عمل مستقیم کافئین روی VSMC ابتدا از طریق کانال های رایانیدین شبکه سارکوپلاسمی رخ میدهد، به دنبال آن تحریک مکانیسم CICR رخ میدهد، که باعث افزایش کلسیم و انقباض گذرای خفیف می شود (Sofi *et al*., 2007). این پاسخ مستقل از مقدار کلسیم خارج سلولی و حضور مسدود کننده های کانال کلسیم است (Watanabe *et al*., 1992) کافئین و آندروزین منوفسفات حلقوی (Cyclic adenosine monophosphate): مطالعات آزمایشگاهی در ارتباط با اثرات کافئین نشان داد که با افزایش کلسیم VSMC اثری مشابه با مواد گشاد کننده عروق دیده می شود (Sato *et al*., 1988; Ozaki *et al*., 1990). کافئین یک مهار کننده غیرانتخابی رقابتی با آنزیم فسفودی استراز است (Umemura *et al*., 2006). این آنزیم دارای ظرفیت کاهش اتصال آنزیم فسفودی استراز در برخی از ترکیبات مانند آندروژین منوفسفات حلقوی (CAMP) و گوانوزین منوفسفات حلقوی را دارد (cGMP). یکی از آنزیم هایی که توسط کافئین مهار میشود 3-5 AMP فسفودی استراز است که عملکرد این آنزیم باعث کاهش CAMP می شود، که در صورت مهار شدن آن توسط کافئین باعث تجمع محلی آن می شود (Butcher *et al*., 1962; Ahn

(*et al*., 1988). تجمع cAMP باعث افزایش فسفوریلاسیون آنزیم کیناز از زنجیره سبک میوزین در محل انقباض سلول می شود. در این حالت، آنزیم حساسیت کمتری نسبت به کلسیم دارد، و در نتیجه از فعالیت آن کاسته می شود. وقتی فعالیت آنزیم کاهش می یابد، فسفوریلاسیون زنجیره سبک میوزین ('MLC) کم می شود و فعالیت میوزین اکتین کم خواهد شد. این موضوع باعث کاهش غلظت درون سلولی کلسیم، بدون انقباض می شود، که تحت عنوان کاهش حساسیت کلسیم مطرح شده است (Endo, 1977; Leijten. and van Breemen, 1984).

9-2-1-2- دیگر مکانیزم های مستقیم:

کافئین همچنین باعث کاهش عملکرد ترکیب تری فسفات اینوزیتول (IP3 می شود که این ترکیب باعث تحریک ترشح کلسیم از شبکه سارکوپلاسمی می شود و همچنین برای انقباض ضروری است. این کاهش عملکرد، تحت تأثیر کافئین ناشی از کاهش اضافه کردن ATP می باشد (Missiaen *et al*., 1994). علاوه بر این، کافئین به طور مستقیم روی ولتاژ کانال های کلسیم در غشای پلاسما اثر گذار است که ورود کلسیم را محدود می کند (Martin *et al*., 1989)، این اثر مستقل از عملکرد مهار کننده فسفو دی استراز میباشد (Hughes *et al*., 1990). مکانیسم کافئین روی سلول های عضلانی کافئین ممکن است مکانیسم های عروق را از طریق اثرات مستقیم یا غیرمستقیم بر VSMC تحت تأثیر قرار دهد اثرات مستقیم: کافئین با تأثیر روی VSMC، باعث ایجاد حداقل انقباض اولیه می شود و پس از آن اثر قابل توجهی روی ماده گشاد کننده عروق دارد. با کمک مکانیسم های مختلف این اثرات قابل توضیح می باشد

10-2-1-2- کافئین و کانال های رایانیدین:

عمل مستقیم کافئین روی VSMC ابتدا از طریق کانال های رایانیدین شبکه سارکوپلاسمی رخ میدهد، به دنبال آن تحریک مکانیسم CICR رخ میدهد، که باعث افزایش کلسیم و انقباض گذرای

خفیف می شود (Watanabe *et al*., 1992). این پاسخ مستقل از مقدار کلسیم خارج سلولی و حضور مسدود کننده های کانال کلسیم است (Sato *et al*., 1988) کافئین و آندروزین منوفسفات حلقوی (Cyclic adenosine monophosphate): مطالعات آزمایشگاهی در ارتباط با اثرات کافئین نشان داد که با افزایش کلسیم VSMC اثری مشابه با مواد گشاد کننده عروق دیده می شود(Sato *et al*., 1988; Ozaki *et al*., 1990). کافئین یک مهار کننده غیرانتخابی رقابتی با آنزیم فسفودی استراز است (Umemura *et al*., 2006). این آنزیم دارای ظرفیت کاهش اتصال آنزیم فسفودی استراز در برخی از ترکیبات مانند آندروژین منوفسفات حلقوی (CAMP) و گوانوزین منوفسفات حلقوی را دارد (cGMP). یکی از آنزیم هایی که توسط کافئین مهار میشود 5-3 AMP فسفودی استراز است که عملکرد این آنزیم باعث کاهش CAMP می شود، که در صورت مهار شدن آن توسط کافئین باعث تجمع محلی آن می شود (Butcher *et al*., 1962; Ahn *et al*., 1988). تجمع cAMP باعث افزایش فسفوریلاسیون آنزیم کیناز از زنجیره سبک میوزین در محل انقباض سلول می شود. در این حالت، آنزیم حساسیت کمتری نسبت به کلسیم دارد، و در نتیجه از فعالیت آن کاسته می شود. وقتی فعالیت آنزیم کاهش می یابد، فسفوریلاسیون زنجیره سبک میوزین ('MLC) کم می شود و فعالیت میوزین اکتین کم خواهد شد. این موضوع باعث کاهش غلظت درون سلولی کلسیم، بدون انقباض می شود، که تحت عنوان کاهش حساسیت کلسیم مطرح شده است (Endo, 1977; Leijten. and van Breemen, 1984) دیگر مکانیزم های مستقیم: کافئین همچنین باعث کاهش عملکرد ترکیب تری فسفات اینوزیتول (IP3 می شود که این ترکیب باعث تحریک ترشح کلسیم از شبکه سارکوپلاسمی می شود و همچنین برای انقباض ضروری است. این کاهش عملکرد، تحت تأثیر کافئین ناشی از کاهش اضافه کردن ATP می باشد (Missiaen *et al*., 1994). علاوه بر این، کافئین به طور مستقیم روی ولتاژ کانال های کلسیم در غشای پلاسما اثر گذار است

که ورود کلسیم را محدود می کند (Martin *et al*., 1989)، این اثر مستقل از عملکرد مهار کننده فسفو دی استراز می‌باشد (Hughes *et al*., 1990).

اثرات غیر مستقیم: اثرات غیر مستقیم کافئین روی VSMC از طریق NO اعمال می شود که توسط eNOS nitric oxide synthase (Endothelial) در سلول های اندوتلیال سنتز می شود که به سرعت به VSMC پخش می شود. وقتی که NO وارد VSMC می شود، به آنزیم گوانیلات سیکلاز متصل می شود و آن را فعال می کند. این فرآیند تبدیل GTP به cGMP را سرعت می بخشد که به دنبال آن باعث افزایش فعالیت یک سری از پروتئین کینازهای وابسته به (PKC cGMP ها) به ویژه نوع Ia می‌شود، PKI دفسفریلاسیون MLC را از طریق فسفاتاز و تولید وازودیلیشن، تحریک می کند. همچنین PKCها و cGMP کلسیم سیتوپلاسمی و IP3 را کاهش می دهند (Guerrero *et al*., 1994)، کافئین به نوبه خود فسفودی استراز cGMP محدود می کند و حتی باعث تجمع بیشتر GMP نیز می شود (Happonen *et al*., 2004)

11-2-1-2- اثر کافئین در دوران بارداری:

آیا نگرانی برای توسعه قلب جنین وجود دارد؟ قرار گرفتن جنین در معرض کافئین حتی می تواند از بدن پدر نیز شروع میشود (Golding, 1995). از آنجا که کافئین یک ترکیب آب گریز است، در رحم مادر، از جفت عبور کرده و به جریان خون جنین می رسد (Brent *et al*., 2011). در یک نتیجه، کافئین می تواند به سرعت باعث آشفتگی در ضربان قلب جنین شود (Oei *et al*., 1989)، مطالعات متعددی نامنظم بودن ضربان قلب جنین، ناشی از مصرف بیش از حد کافئین در زنان باردار را گزارش کردند (Oei *et al*., 1989; Serapiao-Moraes *et al*., 2013). یک مطالعه در موش های ماده باردار نشان داد که مصرف زیاد کافئین باعث افزایش پایدار واکنش سیستم رنین آنژیوتانسین محلی (RAS) در قلب فرزندان بالغ می شود که باعث تغییر در فشار خون و بازسازی

قلبی خواهد شـــد (Serapiao-Moraes *et al*., 2013)، در مطالعه دیگری روی موش های باردار، م صرف متو سط کافئین باعث کاهش جریان خون رحم جفتی می شود و به دنبال آن حجم خون در چرخه جنین جفتی کاهش می یابد. بنابراین، مصـــرف کافئین در مادران باردار توســـعه قلبی عروقی و توزیع جریان خون را می تواند تحت تاثیر قرار دهد (Momoi *et al*., 2008). به طور کلی، به منظور محافظت از تو سعه سی ستم قلبی عروقی جنین در دوران بارداری م صرف روزانه کافئین باید به حداقل برسد یا به طور کل حذف شود.

3-1-2- بافت بیضه

1-3-1-2- دستگاه تولیدمثل موش صحرایی نر

دسـتگاه تولیدمثل جنس نر متشـکل از یک جفت بیضـه، غدد ضـمیمه، سـیسـتمی از مجاری تناسلی و آلت تناسلی می‌باشد. کارکردهای بیضه میتواند از قبیل تولید گامت نر و همچنین تولید و ترشح هورمون های جنسی مردانه باشد که صفات ثانویه جنسی را تولید می‌نماید. غدد ضمیمه د ستگاه تولیدمثل موش نر از قبیل یک جفت کی سه منوی، پرو ستات و غده انعقادی می‌با شد. این غدد بخش عمده مایع منی را ساخته و ا سپرم‌ها در تر شحات این غدد شناورند. مایع منی علاوه بر تغذیه ا سپرم، بعنوان یک ناقل جهت انتقال ا سپرم به د ستگاه تولیدمثل جنس مونث نقش دا شته. پیشاب‌راه موجود در آلت تناسلی دارای عملکردی دوگانه می‌باشد، چون هم مسیر خروج مایع منی و هم ادرار را شامل میشود (Gartner and Hiatt, 2006)(Leblond and Clermont, 1952).

2-3-1-2- بیضه‌ها

در یک موش صحرایی بالغ بی ضه اندامی ا ست با شکل بی ضوی، که داخل کی سه بی ضه جای میگیرد. بیضـــه‌ها هنگام جنینی به‌صـــورت خلف صـــفاقی در دیواره پشـــتی حفره شـــکمی رشـــد

می‌نمایند. یک موش صحرایی با سنی بین 4-6 هفته که به آن موش جوان می‌گویند، بیضه‌ها از حفره شکمی به سمت کیسه‌های اسکروتوم نزول می‌نمایند. حرکت بیضه‌ها به درون حفره شکمی در موشهای صحرایی به علت باز بودن کانال اینگوئینال منجر می‌گردد (Patric E.Sharp *et al.*, 1998). زمانیکه بیضه‌ها به داخل اسکروتوم نزول می‌نمایند، بخشی از صفاق را نیز با خود آورده. این صفاق را تونیکا می‌نامند. تونیکا واژینالیس نیز مانند سایر لایه‌های سروزی بدن از قبیل بافت پوششی سنگ سنگفرشی ساده مزوتلیوم به همراه مقادیر کمی بافت همبند می‌باشد و مواد سروزی ترشح شده از سلول پوششی آن حرکات بیضه را آسان می‌نمایند. پس از تونیکا واژینالیس هر بیضه از طریق یک کپسول ضخیم از جنس بافت همبند متراکم که سفید پرده نامیده میشود احاطه می‌گردد. این پرده‌در سطح خلفی بیضه ضخیم گردیده و مدیاستینوم بیضه را شامل می‌شود که از آن دیواره‌های فیبری به درون غده نفوذ نموده و آن را به لبول‌های هرمی شکل تقسیم می نمایند. پس از تونیکا آلبوژینه، طبقه عروقی وجود داشته که متشکل از شبکه گسترده‌ای از عروق خونی می‌باشد اه خود در بستری از بافت همبند سست قرار دارد و همه دیواره‌ها و لبول‌های بیضه را احاطه می‌نماید (Ross and Pawlina, 2010).

هر لبول بیضه توسط چند لوله منی ساز اشغال گردیده. در هر لبول در لابه‌لای لوله‌های منی ساز بستر نازکی از بافت همبند سست که از تونیکا واسکولوزا منشأ گرفته و غنی از عروق خونی و لنفاوی، اعصاب و سلول‌های بینابینی می‌باشد، قرار داشته، لوله‌های منی ساز اسپرماتوزوئیدها را تولید می‌نمایند. هورمون‌های آندروژنی بیضه توسط سلول‌های بینابینی ترشح میشوند. اسپرم‌ها بعد از تولید در لوله‌های منی ساز، وارد مجاری مستقیم کوتاهی به نام لوله‌های مستقیم می گردند. این لوله‌ها انتهای باز لوله‌های منی ساز را به شبکه بیضه وصل می‌کنند. شبکه بیضه سسیتمی از فضاهای پیچ‌خورده شامل شده که در داخل مدیاستنیوم بیضه قرار می‌گیرد (Gartner and Hiatt, 2006).

اسپرم‌ها در موش صحرایی به وسیله 7 تا 13 لوله کوتاه که به لوله‌های وابران نام دارد از شبکه بیضه خارج‌شده و نهایتاً به قسمت ابتدایی اپیدیدیم رسیده. لوله‌های وابران هنگامی که به اپیدیدیم رسیده در پدی از جنس چربی قرار گرفته که متأسفانه در مطالعات نکروپسی به‌طور عمومی دور ریخته می‌شوند (Patric E.Sharp *et al*., 1998).

3-3-1-2- لوله‌های منی ساز

این لوله‌ها متشکل از لوله هایی پیچ خورده هستند که در داخل لوبول‌های بیضه قرار داشته، ممکن است دارای یک انتهای بسته باشند و یا با وجود یک قوس به سمت بخش میانی کشیده می‌شوند (Goad and Goad, 2002).

اپیتلیوم زایا یا اپیتلیوم منی ساز که به عنوان یک بافت پوششی لوله‌های منی ساز لقب داشته،یک نوع پوشش مطبق مرکب می باشد که در زیر آن لایه قاعده ای مشخصی وجود دارد. در بیرون اپیتلیوم بافت همبندی که تونیکا پروپریا نام دارد لوله‌های منی ساز را شامل می‌شود. تونیکا پروپریا عمدتاً از دسته‌های رشته‌های کلاژن نوع ۱ نازک و درهم‌پیچیده‌ای که دارای چندلایه فیبروبلاست می باشند تشکیل گردیده. بعضی از موجودات از قبیل موش صحرایی، داخلی‌ترین سلول‌های این بافت که به لایه قاعده‌ای اپیتلیوم می‌چسبند متشکل از سلول‌های شبه عضلانی مسطحی می‌باشد که گونه‌ای حلقوی و با چیدمانی شبه اپیتلیومی لوله را دور می‌زنند. این سلول‌ها ویژگی‌های عضله صاف را نشان داده و انقباض آن‌ها موجب حرکت اسپرم‌های شناور در مایع بیضه‌ای به طرف لوله‌های مستقیم می‌گردد (Bacha and Bacha, 2012). بافت بینابینی بیضه فضای بین لوله‌های منی ساز را شامل می شوند. بافت پوششی لوله منی ساز شامل دو جمعیت سلولی بوده و از اینرو مرکب نام داشته. این سلول‌ها شامل سلول‌های سرتولی یا سلول‌های پشتیبان و سلول‌هایی که دودمان اسپرماتوژن شامل می‌شوند. سلول‌های زایا در لایه‌هایی را می‌توان در یک مقطع عرضی از لوله‌های منی سازبه‌صورت مجزا دیده میشود. اسپرماتوگونی‌ها بر روی غشای

قاعده‌ای جای داشته و سپس اسپرماتوسیت ها مشاهده می گردند و انتها یک تا دولایه اسپرماتید داریم که بر روی لایه‌های زیرین جای دارد. این روند از اپیتلیوم زایا شـروع‌شـده و مداوماً از طریق سلول‌های سرتولی حمایت شده تا به شکل نهایی اسپرم ختم گردد (Creasy, 1997).

4-3-1-2- سلول‌های سرتولی

سـلولهای سـرتولی طویل و بشـکل هرمی بوده منظماً در امتداد هم قرار می‌گیرند و یک لایه اپیتلیومی را جهت تشـکیل لوله های منی سـاز بوجود می‌آورند. غشـای جانبی سـلولهای سـرتولی دارای چین خوردگی می‌با شد. ه سته این سلولها ب شکل بی ضی تا مثلثی بوده، دندانه دار و دارای هستک مشخص می‌باشد. حتی این سلول واجد شبکه اندوپلاسمی صاف گسترده میتوکندری زیاد و د ستگاه گلژی کمتر توسعه یافته می‌باشد. سلولهای سرتولی عمری طولانی داشته و تقسیم آنها در دوره تولیـد مثـل، انجـام نمی‌گردد (Gartner and Hiatt, 2006).(Ross and Pawlina, 2010).(Bloom and Fawcett, 1968).

5-3-1-2- اعمال سلول‌های سرتولی

سلول‌های سرتولی تر شحات زیادی دا شته که از جمله‌ی آن به مایع بی‌ضه ای ا شاره می گردد که غنی از فروکتوز بوده و این سـلولهای با ترشـح این مایع به داخل لوله های منی سـاز، منجر به سهولت حرکت آنها به سمت مجاری تنا سلی گردیده. از وظیفه های سلولهای سرتولی میتوان به حفاظت، تغذیه و همچنین فاگوسـیتوز سـیتوپلاسـم باقیمانده اسـپرماتوزوئید های در حال تکامل اشـاره نمود. غبیظ نمودن تسـتوسـترون در درون لوله های منی سـاز وظیفه های پروتئین مت صل شونده به آندروژن می با شد که این پروتئین نیز از سلولهای سرتولی تر شح می‌گردد. این سلول‌ها وظیفه تولید و ترشح ترانسفرین بیضه‌ای را داشته. ترانسفرین بیضه‌ای آپوپروتیینی است که آهن را از ترانسفرین سرم میگیرد و آن را به گامت های در حال بلوغ انتقال می دهند. ترشح هورمون آنتی

مولرین در جنین های مذکر بو سیله سلول‌های سرتولی صورت می‌پذیرد (Ross and Pawlina, 2010).

6-3-1-2- سلول‌های دودمان اسپرماتوژن

این سلول‌ها در چندلایه در کنار هم و در میان سلول‌های سرتولی قرار دا شته و وظیفه تولید اسـپرماتوزوئیدها را دارد. که به این روند تولید اسـپرماتوزوئیدها اسـپرماتوژنز[1] گفته می‌شـود. روند ا سپرماتوژنز شامل تق سیم سلولی از طریق میتوز و میوز و تمایز نهایی ا سپرماتوزوئیدها می‌با شد (Gartner and Hiatt, 2006).

7-3-1-2- اسپرماتوژنز

ا سپرماتوژنزبه فرآیندی که موجب تشکیل ا سپرماتوزوئیدها می گردد گفته می شود. که از یک سلول زایای اولیه به نام اسپرماتوگونی آغاز گردیده و به 3 مرحله قابل تقسیم می باشد. 1- مرحله ا سپرماتو سیتوژنز : این مرحله متشکل از تق سیمات میتوزی پشت‌سرهم سلول‌های ا سپرماتوگونی بوده که در پایان جمعیت مناسبی از سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه تولید می‌گردد. 2- مرحله میوز : در مرحله ثانویه هر سلول اسپرماتوسیت اولیه تشکیل شده از مرحله قبل با صورت گرفتن تقسیم میوز و در پایان تولید چهار سلول‌هاپلوئید ا سپرماتید صورت می‌گیرد. 3- مرحله ا سپرمیوژنز : در مرحله ا سپرمیوژنز سلول‌های ا سپرماتیدی که شکل انها تغییر داده شده ا ست در پایان به ا سپرم تبدیل شده. (Ross and Pawlina, 2010).

ا سپرماتوژنز موش صحرایی از نظم و کارآمد بالایی برخوردار به گونه ای که در موش صحرایی بالغ (سن بی شتر از 10 هفته)، تخریب کمی در سلول‌های زایا دیده شده ا ست (Leblond and Clermont, 1952).

[1] Spermatogenesis

8-3-1-2- ساختار اسپرم بالغ موش صحرایی

با توجه به تغییرهای مورفولوژیکی یک سلول ساده گرد، اسپرماتید تشکیل می‌شود. ماده ژنتیکی داخل هسته شدیداً متراکم گردیده و در ازای قسمت سر که با یک پوشش گلیکوپروتئینی که آکروزوم نامیده می شود پوشانده می شود، کشیده شده. در این حالت سیتوپلاسم به یک دم شلاق مانند شکل گرفته که یک تاژک و میتوکندری محکم بسته‌بندی‌شده را شامل می‌شود (Creasy, 1997).

9-3-1-2- بافت بینابینی بیضه[1]

فضاهای بین لوله‌های منی ساز بیضه در هر لبول توسط اجتماعاتی از بافت همبند، اعصاب و رگ‌های خونی و لنفاوی اشغال گردیده. با توجه به اینکه مویرگ‌های بیضهریال منفذ دار هستند و عبور آزاد ماکرومولکول‌هایی نظیر پروتئین‌های خون را ممکن می‌سازند. بافت همبند از فیبروبلاست ها، سلول‌های همبند تمایز نیافته، ماستوسیت ها و ماکروفاژها ساخته شده. درمیان این بافت همبند مجموعه‌های کوچکی از سلول‌های درون‌ریزی که سلول‌های بینابینی نامیده می شوند قرار گرفته که هورمون تستوسترون ترشح می کنند. هورمون تستوسترون ترشح شده از این سلول‌ها، مسئولیت تولید صفات ثانویه جنسی را دارد (Gartner and Hiatt, 2006).

10-3-1-2- مجاری تناسلی

مجاری تناسلی به دو دسته داخل و خارج بیضه ای تقسیم می‌گردند:

مجاری تناسلی داخل بیضه‌ای

مجاری تناسلی که در داخل بیضه‌ها هستند، لوله‌های منی ساز را به اپیدیدیم وصل می‌نمایند و از لوله‌های مستقیم، شبکه بیضه‌ای و لوله‌های وابران تشکیل گردیده. این مجاری مسئول حمل

[1] Interstitial Tissue

اسپرماتوزوئیدها و مایع بیضه‌ای از لوله‌های منی ساز به مجاری اپیدیدیم هستند (Ross and Pawlina, 2010).

مجاری تناسلی خارج بیضه‌ای

مجاری تناسلی خارجی شامل اپیدیدیم، مجرای دفران، مجرای انزالی و پیشاب‌راه است.

اپیدیدیم

اپیدیدیم در موش صحرایی مجرایی منفرد و پیچ‌خورده به طول تقریباً ۱۸۰ سانتیمتر است که آرایش سلولی آن به صورت اپیتلیوم کشیده است. قطر مجرا و تراکم اسپرم‌های درون آن بسته به شرایط متفاوت است و ارتباط تنگاتنگی با میزان ترشح هورمون‌های بدن دارد. اپیدیدیم به همراه بافت همبند و عروق خونی اطراف خود سر، تنه و دم اپیدیدیم را تشکیل می‌دهد(Creasy, 1997)(Leblond and Clermont, 1952).

اپیدیدیم موش‌های صحرایی بالغ به صورت نرمال دارای خصوصیات مورفولوژیکی بسیار ثابتی است و اختلالات غیر نرمال بسیار کمی دارد. توجه داشته باشید که مناطق مختلف اپیدیدیم (قسمت ابتدایی، سر، تنه و دم) همگی ازنظر بافت‌شناسی، عملکردی و نوع حرکت متفاوت هستند. (Creasy, 1997).

مجرای دفران

لوله‌ای مستقیم با دیواره‌ای عضلانی، ضخیم و مجرایی باریک است که از اپیدیدیم تا پیشاب‌راه پروستاتی ادامه یافته و در آن تخلیه می‌شود. دیواره مجرای دفران شامل طبقه مخاطی، عضلانی و ادوانتیس است. طبقه عضلانی انقباضات دودی (پریستالتیک) قدرتمندی را ایجاد می‌کند که در هنگام انزال به بیرون راندن اسپرماتوزوئیدها کمک می‌کند(Bacha and Bacha, 2012).

11-3-1-2- آلت تناسلی

ادرار و مایع منی از طریق مجرای پیشـــاب‌راه موجود در آلت تناســـلی به خارج از بدن هدایت می‌شوند. موش‌های صحرایی نر دارای Os Penis هستند که باکولوم نامیده می‌شود. باکولوم از یک غضــروف منفرد (اســتخوان آلت تناســلی) ســاخته‌شــده اســت‌که درجفت‌گیری به حیوان کمک می‌کند(Patric E.Sharp *et al*., 1998).

12-3-1-2- غدد ضمیمه دستگاه تولیدمثل

این غدد در جوندگان شامل کیسه‌های منوی[1]، پروستات[2] و غده انعقادی[3] می‌شوند و ترشحاتی را تولید می‌کنند که برای فعالیت تولیدمثل جنس نر ضروری است(Bacha and Bacha, 2012).

4-1-2- تیو استامید

1-4-1-2- تیواستامید و ویژگی های آن

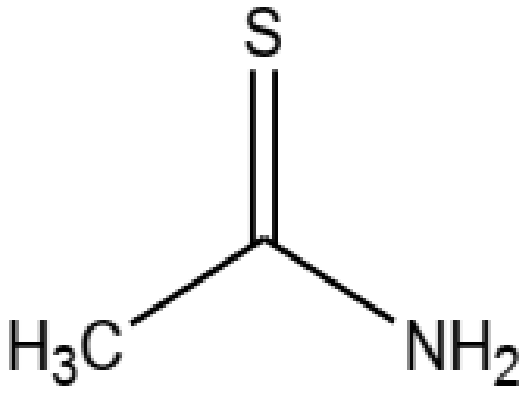
تیواســـتامید یک ترکیب آلی میباشـــد که دارای گوگرد بوده و با فرمول مولکولی C_2H_2NS می‌باشــد این ترکیب دارای جرم مولکولی 75/13g/mol میباشــد. در دمای ۱۱۰NC° به نقطه ی ذوب رسیده و حلالیت آن در آب برابر ۱۷۳ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب است. این ترکیب به صورت پودر کریستالی سفید رنگ می‌باشد و بویی مشابه به مرکاپتانها را داراست. ترکیبات آلی گوگرد دار به طور معمول در پساب ها و رسوب ها دیده می شوند و به دلیل بوی بدشان از نظر محیطی مورد توجه اند (Sharma, 2000). اثرات سمی تیو استامید بر روی محیط سبب شده که آن را به عنوان یک آلاینده محیطی در نظر بگیرند (Cinghita, 2008). این ماده باعث بروز صـــدمات و تومورهای کبدی شــده و وقتی غلظت آن در بدن به ۲۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم از وزن بدن برســد از ســنتز

[1] Seminal Vesicles

[2] Prostate

[3] Coagulating Gland

پروتئین ها جلوگیری می کند (Satyabhama *et al*., 1984). تیراستامید نه تنها در کبد، بلکه در دیگر بافتها مثل کلیه ها، غدهی تیموس، طحال، روده و ریه ها نیز باعث ایجاد تغییرات ساختاری و عملکردی می شود (Sirag *et al*., 2006). ترکیبات آلی حاوی گوگرد مانند تیواستامید کاربردهای صنعتی و غیر صنعتی زیادی دارند مانند: استفاده از آن به عنوان حلال آلی در صنایع چرم، نساجی و کاغذ، شتاب دهنده در ولکانش لاستیک ها، پایدار کننده ی سوخت موتور، جایگزین برای هیدروژن سولفید در تجزیهی کیفی، واکنشگر در تبدیل نمک فلزات به نانوذرات، علف کش، قارچ کش و بازدارنده ی خوردگی تیوا ستامید به عنوان دارو برای درمان سل و جذام مقاوم به چند دارو نیز به کار می رود (Liddell *et al*., 2004).



شکل 1-2- ساختار تیواستامید

5-1-2- استرس اکسیداتیو

استرس اکسیداتیو (عامل اکسید شدن) فر ایند پیروزی رادیکال های آزاد بر دفاع آنتی اک سیدانی بدن ما ست و به نوعی به حمله های بیولوژیک به اُرگانیسم بدن تعبیر می شود. به بیان دیگر، استرس اکسیداتیو به عنوان عامل بر هم زنندۀ تعادل میان تولید رادیکال های آزاد و دفاع های آنتی اکسیدانی تعریف می‌شود. اصطلاح استرس اکسیداتیو و رادیکال های آزاد در سال

های اخیر به کلمات آشنایی تبدیل شده است. "اکسیداسیون" اصطلاح شیمیدانان برای فرایند از بین بردن الکترون ها از یک اتم یا مولکول است. نتیجه این تغییر می تواند مخرب باشد، زنگ زدن آهن نتیجه آشنای اکسیداسیون است. در اینجا، اکسیژن عامل مسئول است، اما دیگر عوامل اکسید کننده، مانند کلر، هم می‌توانند ناگوار باشند (34).

سیستم دفاع آنتی اکسیدانی به دو دسته تقسیم می‌شوند: یکی دفاع آنتی اکسیدانی غیرآنزیمی که مشتمل بر ملکول‌های کوچک نظیر ویتامین E ، اسکوربات و گلوتاتیون می‌باشد و دیگری دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی سلول که شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز است. استرس اکسیداتیو در محیط سلولی منجر به تشکیل لیپید پراکسیدهای ناپایدار و واکنشگر می شود . تجزیه پراکسیدهای ناپایدار و مشتق شده از اسیدهای چرب غیر اشباع منجر به تشکیل مالون دی آلدئید(MDH) می شود(35). غلظت دقیق MDH با کروماتوگرافی تعیین می‌شود. همچنین MDH با روش کلومتری با استفاده از واکنشی که با اسیدتیوباربیتوریک می‌دهد تعیین می‌شود (36).

اگر چه ما به اکسیژن نیاز داریم تا زنده بمانیم، اما غلظت های بالای آن در واقع خورنده و سمی است. ما انرژی را از طریق سوزاندن با سوخت اکسیژن به دست می‌آوریم . با ترکیب مواد غذایی هضم شده با اکسیژنی که از هوا استشمام می‌کنیم، این یک فرایند کنترل متابولیک است که، متأسفانه، محصولات فرعی خطرناکی هم تولید می‌کند. اینها شامل رادیکال های آزاد هم می شوند، رادیکال های آزاد از نظر الکترونیکی اتم ها یا مولکول های ناپایداری هستند. آنها قادر به جدا کردن الکترون ها از هر مولکول دیگری که در تلاش برای دستیابی به ثبات به آنها برخورد می کنند هستند. به دنبال این، آنها حتی مولکولهای بی ثبات تری ایجاد می‌کنند که در واکنش های زنجیره ای دومینو مانند به همسایگانشان حمله می‌کنند. در مدتی که زنجیره ای از رادیکال

های آزاد تقلا می‌کنند، ممکن است از طریق اجزای حیاتی سلول ها آسیب های گسترده ای را به بدن وارد کنند. استرس اکسیداتیو، کل بار قرار گرفته روی موجودات زنده به وسیله تولید ثابت رادیکال های آزاد در جریان طبیعی سوخت و ساز بدن و همچنین هر آن چه که از فشارهای دیگر محیط به ارمغان می‌آید و بدن باید آن را تحمل کند (تشعشع طبیعی و مصنوعی، سموم موجود در هوا، غذا و آب و منابع متفرقه فعالیت اکسید کننده، مانند دود تنباکو) است. بدن ما در برابر این حملات درمانده نیست. ما دفاع هایی در برابر استرس اکسیداتیو به شکل موانع فیزیکی داریم. این موانع برای محدود نگاه داشتن رادیکال های آزاد در مکان های تولیدشان در داخل سلول است. آنزیم هایی که اشکال واکنشی خطرناک اکسیژن را خنثی می‌کنند، مواد موجود در رژیم غذایی ما (مانند ویتامین ث و ویتامین ای) است که می تواند رادیکال های آزاد را با اهدای الکترون ها به آنها و قطع واکنش های زنجیره ای اولیه در جایشان" فرو نشاند"؛ از دیگر دفاع ها ترمیم سازوکارها برای مراقبت از آسیب اکسیداتیو به DNA است، همچنین پروتئین ها و غشاها و نیز پاسخ های استرسی پیچیده ای که شامل خودکشی برنامه ریزی شده سلول است از دفاع های دیگر است. اگر خسارت بیش از حد بزرگ باشد این خودکشی انجام می‌شود (37).

به این ترتیب این تصور ایجاد می‌شود که سلامتی بستگی به تعادل بین استرس اکسیداتیو و دفاع آنتی اکسیدان دارد. پیری و بیماریهای مربوط به سن منعکس کننده ناتوانی دفاع آنتی اکسیدانی ما برای مقابله با استرس اکسیداتیو در طول زمان است. خبر خوب این است که با سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی قوی، داشتن عمر طولانی و بدون بیماری ممکن است. تمام واکنش های شیمیایی که در بدن ما اتفاق می افتند از اکسیژنی که تنفس می‌کنیم، استفاده می کنند. اما واکنش های شیمیایی، از این اکسیژن، رادیکال های آزاد تولید می‌کند، که مقدار بیش از حد آن خطر سمی شدن بدن را به همراه دارد. بنابراین، سیستم دفاعی بدن ما مولکول هایی تشکیل شده از آنتی اکسیدان ها را در اختیار دارد، که این مولکول هایِ آنتی اکسیدان وظیفه دارند رادیکال

های آزاد اضافی را از بین ببرند. این سیستم دفاعی دائماً در یک حالت تعادل قرار دارد، از یک سو رادیکال های آزاد تولید می‌کند و از سوی دیگر این رادیکال های آزاد را به وسیله آنتی اکسیدان ها از بین می برد. هر گونه نابهنجاری در این زمینه، مانند وجود رادیکال‌های آزاد بیش از حد یا نبودن آنتی‌اکسیدان به مقدار کافی اختلال های زیان آوری برای بدن به همراه خواهد داشت. این نابهنجاری می‌تواند بر اثر برخی بیماری ها، پیری و حتی یک تغذیهٔ نامتعادل به وجود آید (34).

2-2- بررسی منابع

نوروزی و شریعتی (1399) به بررسی اثر حفاظتی ویتامین D بر اسپرماتوژنز و تغییرات بافت‌شناسی بیضه موش‌های صحرایی بالغ تیمار شده با تیواستامید پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که میانگین وزن بیضه‌های راست و چپ و تعداد سلول‌های سرتولی در تمام گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل تغییر معناداری نشان نداد. میانگین وزن بدن در تمام گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری نشان داد . میانگین غلظت سرمی هورمون‌های تستوسترون، FSH، تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در گروه‌های تجربی 2 و 3 نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری نشان داد. میانگین غلظت سرمی هورمون LH و تعداد سلول‌های لیدیگ در گروه‌های تجربی 2، 3 و 4 نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری نشان داد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه تجربی 2 نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری نشان داد.

حاجی نژاد و همکاران (1398) به بررسی اثر تجویز طولانی‌مدت نانو ذرات نیکل اکسید (Nio) سنتز شده به روش سبز بر هیستوپاتولوژی کبد، کلیه و بیضه‌ی موش صحرایی پرداختند. آن‌ها نشان دادند در موش‌های تیمار شده با دز 50 میلی‌گرم/کیلوگرم، ALT و AST سرم از گروه شاهد بیشتر بود. سطح BUN و کراتینین سرم موش‌های تیمار شده با دز 50 میلی‌گرم/کیلوگرم نیز بیشتر بود. در بررسی هیستوپاتولوژی، نکروز و تجمع چربی در کبد گروه تیمار شده با دز 50 میلی‌گرم/کیلوگرم مشاهده شد. در کلیه، تورم توبول پروکسیمال و در بیضه، نکروز سلولی مشاهده گردید. ازاین‌رو تجویز طولانی‌مدت نانو ذرات NiO اثر سمی بر کبد، کلیه و بیضه‌ی موش صحرایی دارد.

حاجی نژاد و سام زاده (1398) به بررسی هیستوپاتولوژیک اثر تجویز داخل صفاقی نانوترکیب پلی آنیلین/منیزیم اکسید در بافته‌ای کبد و کلیه‌ی موش‌های صحرایی پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد در گروه تیمار شده با دز 4 میلی‌گرم نانوکامپوزیت Polyaniline-grafted starch/Magnesium oxide، افزایش معنی‌داری در آنزیم‌های ALT و AST در مقایسه با گروه شاهد سالم مشاهده گردید،

اما میزان BUN وکراتینین اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در بررسی‌های بافت‌شناسی در سیتوپلاسم سلول‌های گروه تیمار شده با دز بالای نانوکامپوزیت Polyaniline-grafted starch/Magnesium oxide تجمع چربی خفیف مشاهده شد. در بررسی بافته‌ای کلیه، تورم خفیف توبول پروگزیمال مشاهده شد. به نظر می‌رسد نانوترکیب Polyaniline-grafted starch/Magnesium oxide دارای اثر سمیت کبدی و کلیوی است.

در مطالعه‌ای Kharaji Belali و همکاران (2019) نشان دادند مصرف مقادیر 45 و 26 میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه کافئین از طریق آب آشامیدنی توسط موش‌های صحرایی مادر در دوران بارداری و شیردهی باعث کاهش وزن بدن، وزن و حجم بیضه و کاهش تعداد سلول‌های سرتولی و اسپرماتوژنیک اعم از اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و اسپرم در بیضه نوزادان نر در دوره قبل و بعد از بلوغ می‌گردد. نتایج نشان داد کافئین می‌تواند باعث تغییرات هیستوپاتولوژیک در بیضه نوزادان موش صحرایی گردد که این تغییرات حتی تا 120 روز پس از تولد باقی‌مانده و برگشت‌ناپذیر می-باشند.

Wilsonn و همکاران (2011) در مطالعه‌ای در مورد یکی از غدد ضمیمه تناسلی مذکر گزارش کردند مصرف روزانه 6 فنجان قهوه یا بیش‌تر باعث کاهش خطر ابتلاء به سرطان کشنده پروستات شد اما با سرطان خوش‌خیم و غیر پیشرفته پروستات ارتباطی نداشت.

Sarobo و همکاران (2012) در مطالعه خود گزارش کردند به دنبال تجویز 20 میلی‌گرم بر لیتر کافئین از طریق آب آشامیدنی به موش‌های صحرایی به مدت 120 روز (معادل مصرف متوسط روزانه 2 تا 4 میلی‌گرم بر کیلوگرم در انسان)، پرولیفریشن و هیپرتروفی سلول‌های اپی‌تلیال و افزایش بیان گیرنده‌های آندروژنی در لوب شکمی پروستات مشاهده شد که با هیپرپلازی خوش‌خیم پروستات در ارتباط است.

Ramula Hansen و همکاران (2008) در مطالعه خود گزارش کردند حجم مایع منی، میزان هورمون تستوسترون و اینهیبینB (Inhibin-B) (گلیکوپروتئن ترشح شونده از سلول‌های سرتولی) پسرانی که مادران آن‌ها طی دوران بارداری هر روز 3 تا 7 قهوه می‌نوشیدند کاهش دارد، آن‌ها ابراز داشتند کافئین با جلوگیری از تمایز بافت بینابینی بیضه و سلول‌های لیدیگ باعث کاهش میزان تستوسترون در بیضه جنین موش صحرایی می‌شود.

فصل سوم

مواد و روش ها

3-1- نمونه آماری

با توجه به اینکه این تحقیق باید بصورت آزمایشگاهی انجام بشود بر اساس راهنمایی و مشاوره ا ساتید راهنما و م شاور پایان نامه تعداد 40 سر خرگوش سفید نیوزلندی جهت انجام تحقیقات آزمایشـــگاهی تهیه گردید. خرگوش ها در 4 گروه 10 تایی در قفس های جداگانه در اتاقی با حرارت 2± 20 درجه سانتی گراد، رطوبت 40٪ و چرخه رو شنایی – تاریکی 12 ساعته نگهداری شدند. آب و غذای استاندارد و کافی در اختیار آنها قرار داشت.

3-2- روش تهیه سرم

لوله‌های حاوی خون را برای مدت 30 دقیقه در دمای معمولی اتاق قرار داده تا خون‌ها کاملاً لخته شـوند. بعد لوله‌ها را با دور 3000 و به مدت 10 دقیقه سـانتریفیوژ کرده تا سـرم جدا شـود. سپس با دقت فراوان به کمک سمپلر و سر سمپلر سرم خارج و درون میکروتیوب‌ها ریخته شد و در فریزر در دمای 20- درجه سـانتی گراد نگه داری شـد تا برای اندازه گیزی میزان سـوپر اکسـید دیسموتاز و کاتالاز مورد استفاده قرار گیرد.

3-3- تست های آزمایشگاهی بر روی نمونه سرم خون

به منظور ارزیابی و مقای سه عملکرد کبد در گروه‌های مختلف ترانس آمینازهای سرمی شامل آلانین آمینو تراسفراز و آسپارتات آمینو ترانسفراز و آلکالین فسفاتاز با استفاده از دستگاه اتو آنالیزر اندازه گیری شد.

3-4- اندازه گیری فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی:

فعالیت آنزیم کاتالاز(CAT) و آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) با استفاده از کیت تجاری (Zell bio آلمان) و با توجه به دستور العمل سازنده انجام شد.

3-5- پروتکل اندازه گیری کاتالاز

آماده سازی معرف:

برای کیت 48 تایی 6 میلی لیتر آب مقطر 2 بار تقطیر شـــده به پودر کروموژن(R3) قبل از ا ستفاده ا ضافه شد.10 میکرولیتر نمونه را داخل چاهک‌ها ریخته و سپس 100 میکرولیتر معرف R1 را به چاهک‌ها ا ضافه می شود. سپس 10 میکرولیتر معرف R2 را ا ضافه نموده بخوبی مخلوط کرده و به مدت یک دقیقه در دمای 37 درجه انکوبه می‌کنیم. در مرحله‌ی بعد 100 میکرولیتر معرف R3 را به چاهک‌ها اضـــافه کرده و در نهایت 10 میکرولیتر معرف R4 اضـــافه می‌شـــود. آنگاه مواد بالا بخوبی مخلوط کرده و توسط الایزا ریدر در طول موج 405 nm قرائت شده و سپس توسط فرمول محاسبه شد.

3-6- پروتکل اندازه گیری سوپر اکسید دیسموتاز

آماده سازی معرف ها:

R1 با 13 میلی لیتر آب مقطر 2 بار تقطیر شده حل شد

R3 با معرف R4 مخلوط و حل شد

3-6-1- روش انجام آزمایش

بلانک	نمونه	
10 میکرولیتر	10 میکرولیتر	نمونه
250 میکرولیتر	250 میکرولیتر	R1
10 میکرولیتر	10 میکرولیتر	R2
10 میکرولیتر	10 میکرولیتر	آب مقطر 2 بار تقطیر شده
-	20 میکرولیتر	کروموژن
20 میکرولیتر	-	آب مقطر 2 بار تقطیر شده

سپس مطابق جدول فوق مقادیر در میکروپلیت ریخته شد و خوب مخلوط شد و در زمان‌های صفر و 2 دقیقه توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج 420 nm قرائت شد و میزان فعالیت SOD در فرمول مربوطه محاسبه شد.

7-3- اندازه گیری مالون دی آلدئید سرم

سنجش ترکیبات واکنش دهنده با تیوباربیتوریک اسید(TBARS) یکی از متداول ترین روش‌ها در مطالعات مربوط به رادیکال‌های آزاد می‌باشد، اندازه گیری کمپلکس حاصل از واکنش تیوباربیتوریک اسید با آلدئیدهای حاصل از فرایند لیپید پر اکسیداسیون و به ویژه مالون دی آلدئید (MDA) می‌باشد. در تست اندازه گیری ترکیبات واکنش دهنده با تیوباربیتوریک اسید، از آنجایی که رادیکال‌های آزاد نیمه عمر کوتاهی دارند بنابراین ارزیابی استرس اکسیداتیو به طور مستقیم به سادگی میسر نیست، و برای آن باید میزان فعالیت آنتی اکسیدانی را بررسی کرد و یا مقدار محصولات ناشی از استرس اکسیداتیو مثل MDA که محصول نهایی حاصل از پر اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع است تعیین نمود که در واقع حاکی از افزایش حضور رادیکال‌های آزاد می‌باشد. میزان پر اکسیداسیون چربی‌ها از طریق اندازه گیری مقادیر MDA مورد بررسی قرار می‌گیرد.

پروتکل انجام آزمایش:

محلول سازی:

برای تهیه محلول TCA،10 سی سی آب مقطر دو بار تقطیر شده را با 1 گرم TCA مخلوط شد.

برای تهیه محلول TBA، 0.067 گرم TBA به 10 سی سی آب مقطر دو بار تقطیر شده اضافه شد.

روش انجام آزمایش:

100 میکرولیتر نمونه سـرمی را به 250 میکرولیتر TCA که از قبلا درون میکروتیوب ریخته شده بود اضافه کرده و به مدت 15 دقیقه در بن ماری با دمای 100 درجه سانتی گراد قرار دادیم. سـپس نمونه‌ها را داخل میکروسـانتریفیوژ قرار داده و به مدت 10 دقیقه با دور 3000 در دقیقه گذاشتیم. سپس مایع رویی را برداشته و به میکروتیوب‌هایی که حاوی 25 میکرولیتر TBA هستند اضافه می‌شود و دوباره به مدت 15 دقیقه در حمام آب گرم با دمای 100 درجه سانتی

گراد قرار داده می شوند. در نهایت مایع را در پلیت الایزا ریخته و توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج 490nm قرائت کرده و سپس عدد بدست آمده را از فرمول محاسبه می‌شود.

داده ها پس از ورود به نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شـدند؛ به این ترتیب که پس از تأیید پارامتریک بودن داده ها با اسـتفاده از آزمون کولموگورو- یک طرفه و تسـت تعقیبی ANNOVA اسـمیرنوو، از آزمون توکی برای تجزیه و تحلیل داده های آزمون های بیوشـیمیایی و برای رخداد رفتار موردنظر درگروه ها اسـتفاده شـد و تمام نتایج به صـورت میانگین±خطای اسـتاندارد بیان گردید .در تمام بررسی ها $P<0/05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

برای سـنجس MDA نمونه ها را در پلیت الایزا ریخته و توسـط دسـتگاه الایزا ریدر در طول موج 490nm قرائت گردید و سپس عدد بدست آمده را از فرمول مشخص محاسبه گردیدکه میانگین آن‌ها در شکل 3-4 مشاهده می‌شود.

فصل چهارم

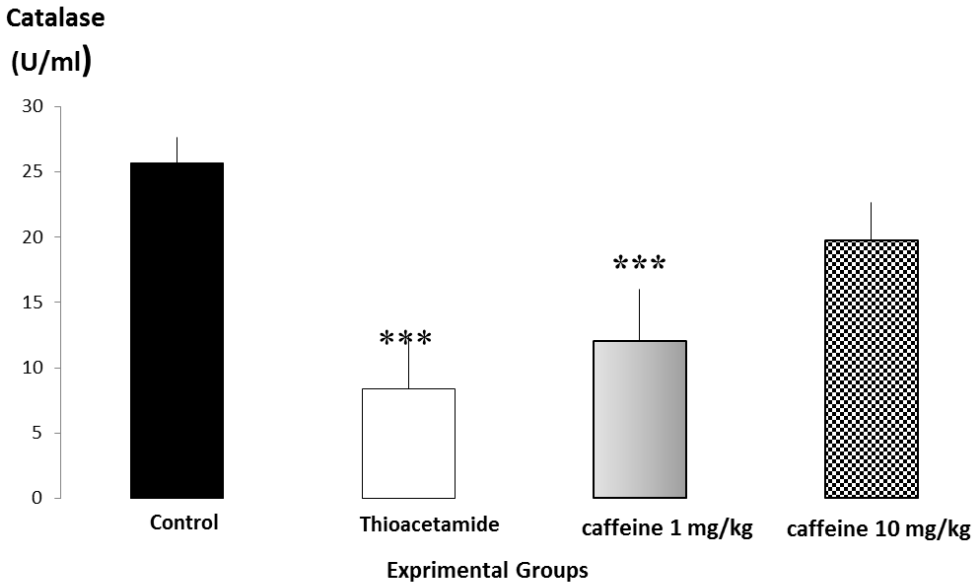
نتایج و بحث

4-1- نتایج

4-1-1- نتایج سنجش کاتالاز (CAT) در سرم

بعد از خوانش میزان OD بلانک و نمونه‌ها در طول‌موج 405 نانومتر توسط دستگاه الایزاریدر و استفاده از فرمول موجود در کیت که در فصل مواد و روش کار آمده است میزان فعالیت آنزیم CAT محاسبه شد که میانگین آن‌ها در شکل 4-1 نشان داده می شود. همانگونه که نتایج نشان می‌دهد بین گروه‌های شاهد و کافئین 10mg/kg در صد تفاوت معنی داری در میزان کاتالاز سرم مشاهده نشد، ولی بین دو گروه تیوا ستامید و گروه تیمار شده با 1 mg/kg کافئین تفاوت معنی داری در سطح 5 درصد وجود دارد ($p<0/05$)، با توجه به نتایج می‌توان گفت تجویز تیواستامید در موش‌های مورد مطالعه موجب تنظیم معنی داری در سطح آنزیم کاتالاز آنها و از طرفی در گروه استفاده کننده کافئین مشاهده میشود که سطح کاتالاز با افزایش کاربرد کافئین افزایش معنی داری دارد.

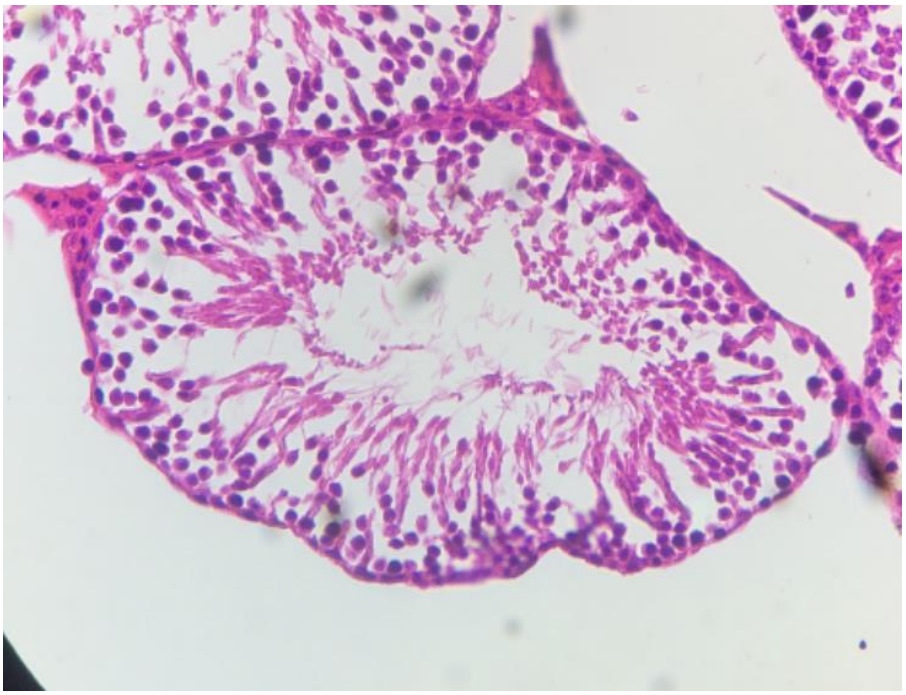
تجویز کافئین با دوز 10 میلی گرم برکیلوگرم سبب افزایش سطح کاتالاز در سرم موش های صحرایی شد که نسبت به گروه دریافت کننده تیواستامید (به تنهایی) افزایش معنی داری داشت.



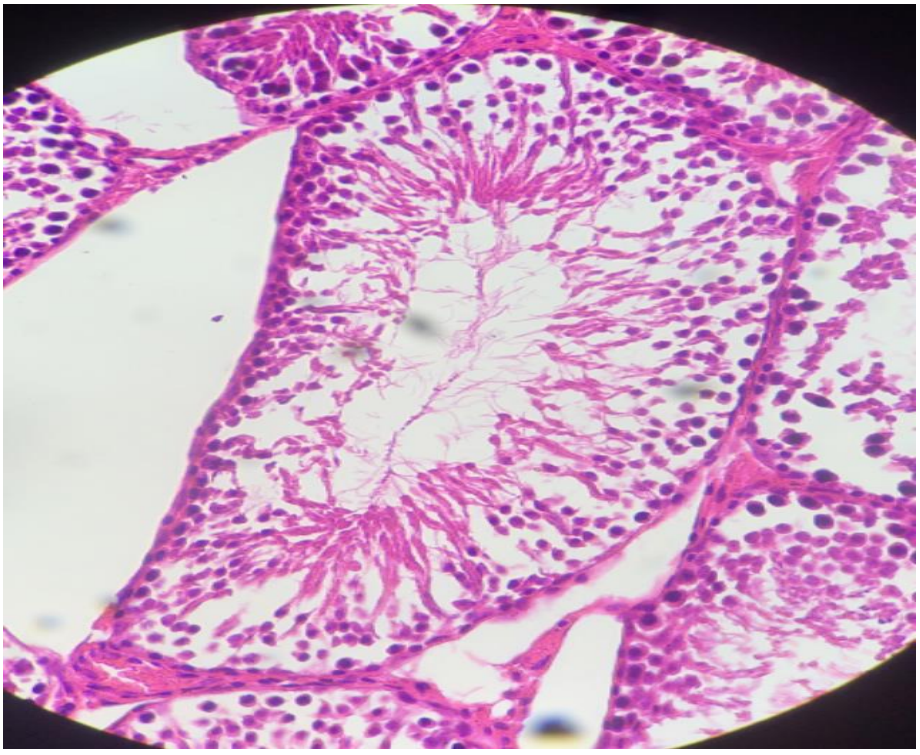
شکل 1-4- نتایج سنجش کاتالاز سرم در خرگوش سفید نیوزلندی

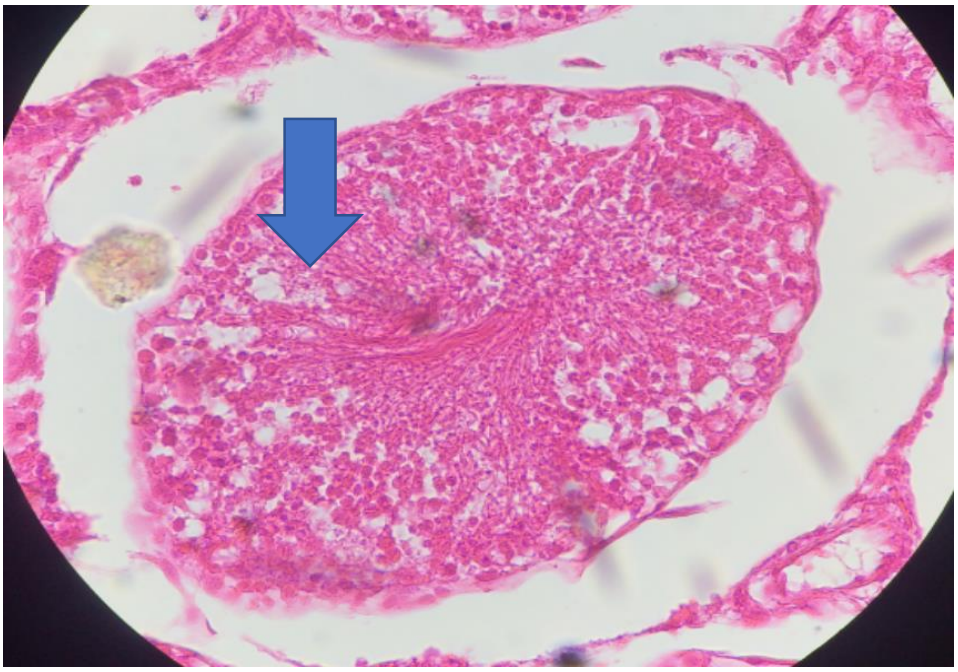
در گروه مســـموم شـــده با تیواســـتامید که کافئین را با دوز 1 میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کرده بودند سطح انزیم کاتالاز در سرم نسبت به گروه کنترل منفی (مسموم شده با تیواستامید و دریافت کننده ی سرم فیزیولوژی) بالاتر بود اما بررسی اماری نشان داد که اختلاف معناداری بین دو گروه وجود ندارد.

(*** نشان دهنده ی اختلاف معنا دار با گروه شاهد $P<0/001$ است)

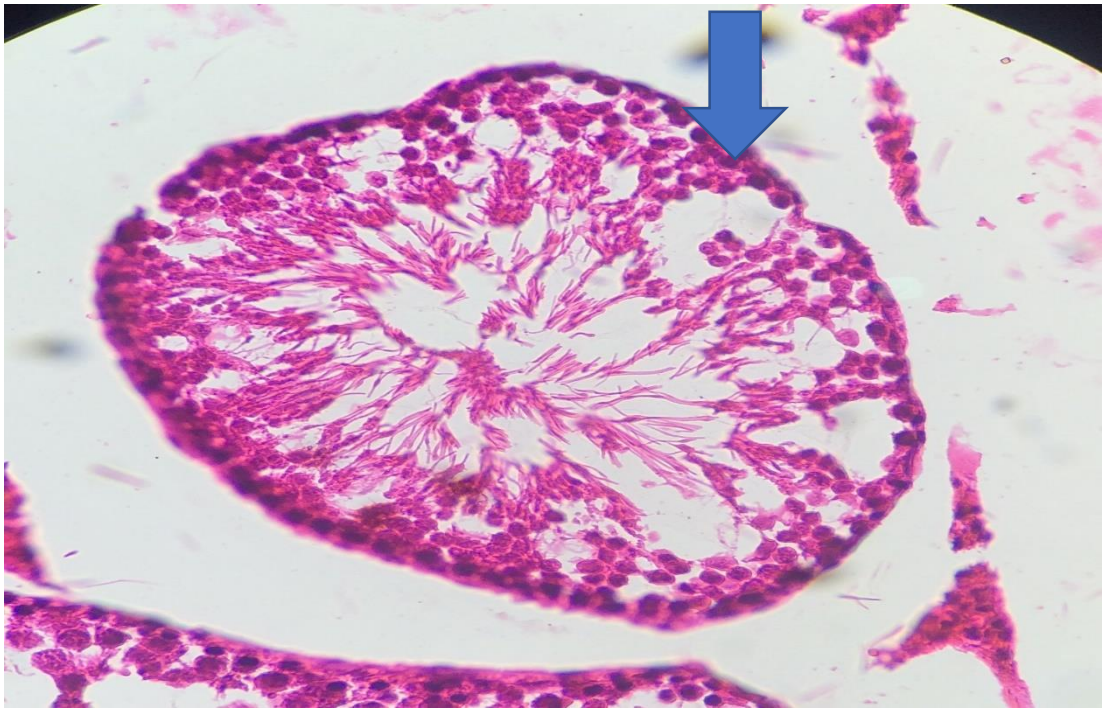


«سلول سالم بافت بیضه»



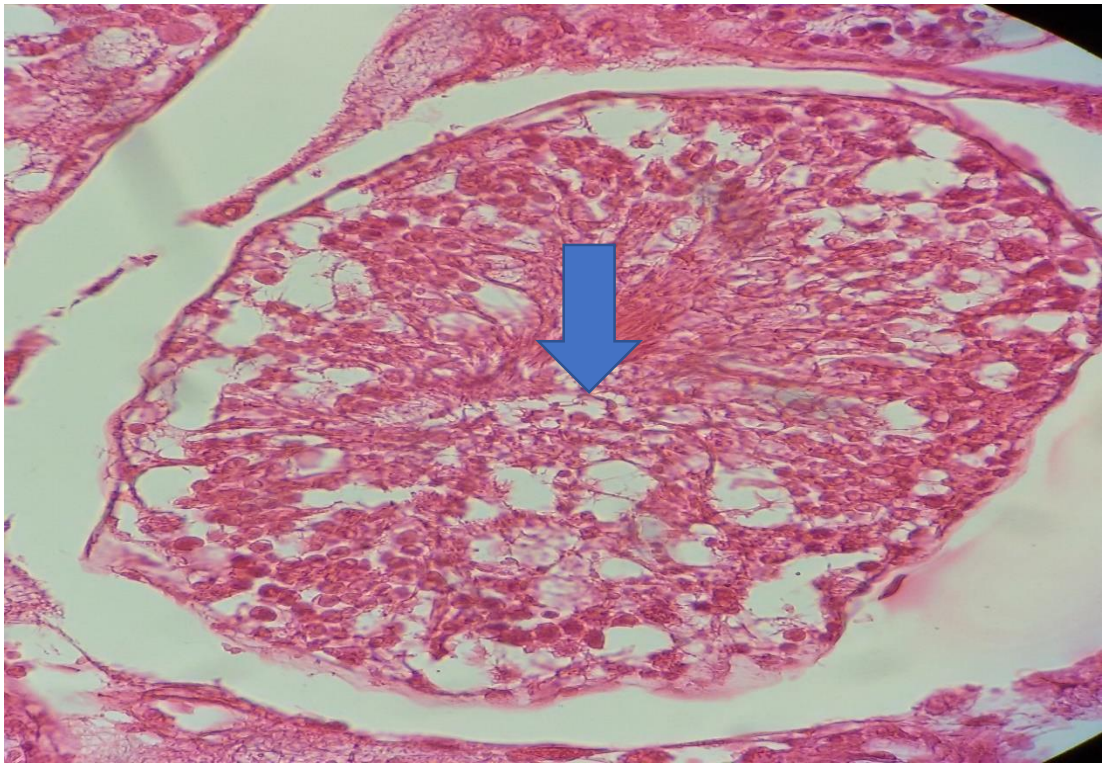


«کاهش سلولی-کافیین با دوز 1 میلی گرم»

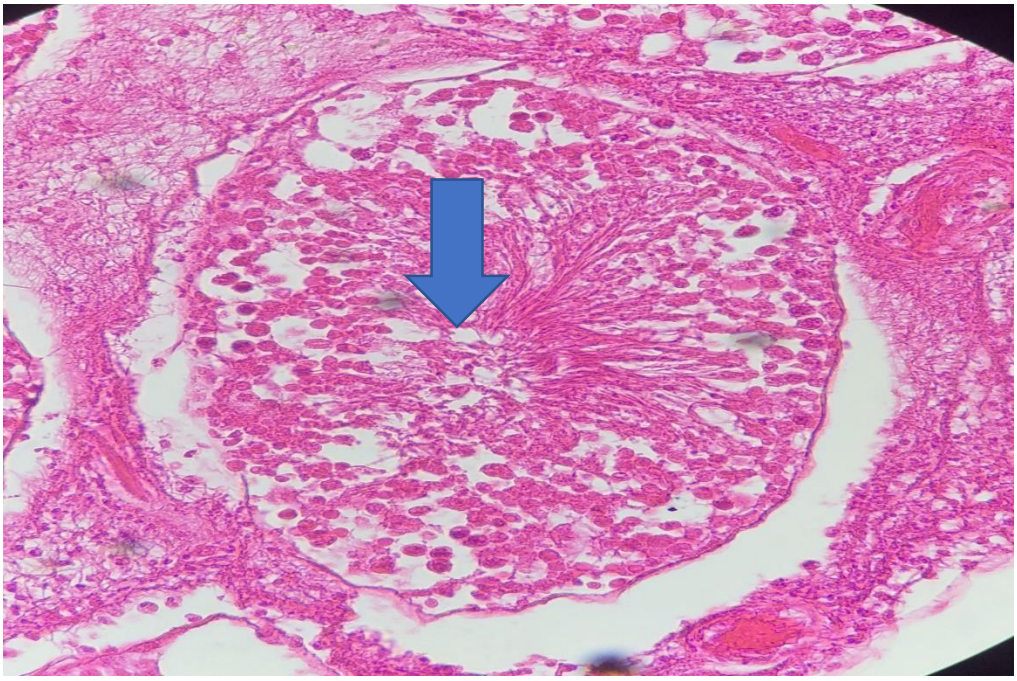


«کاهش سلولی کافیین با دوز 10»

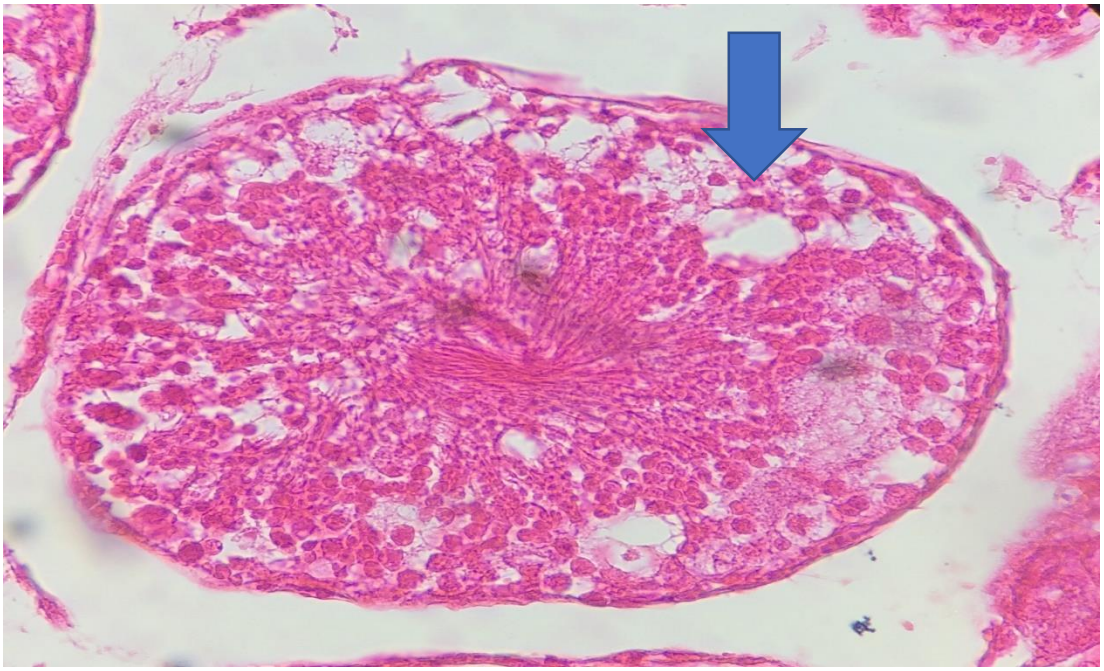
«کاهش سلولی-کافیین با دوز 10 میلی گرم»



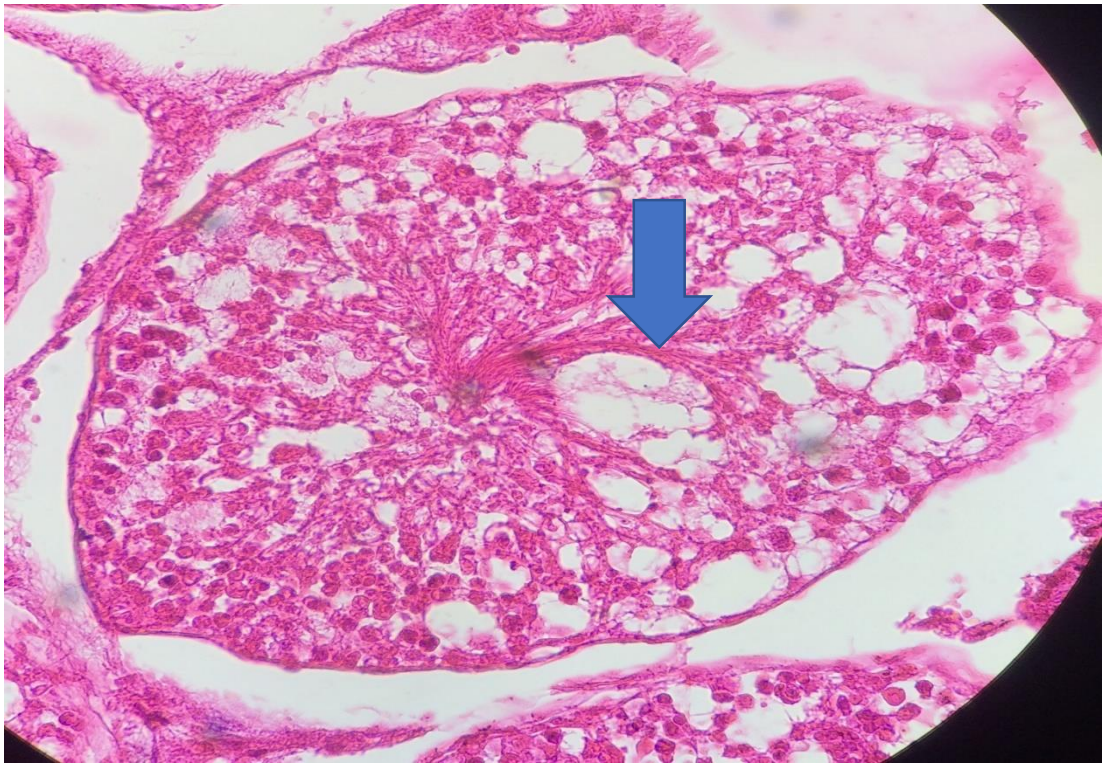
«اسیب شدید و تغییر واکویلازیسیون»



«کافیین با دوز 1 میلی گرم-اسیب شدید»



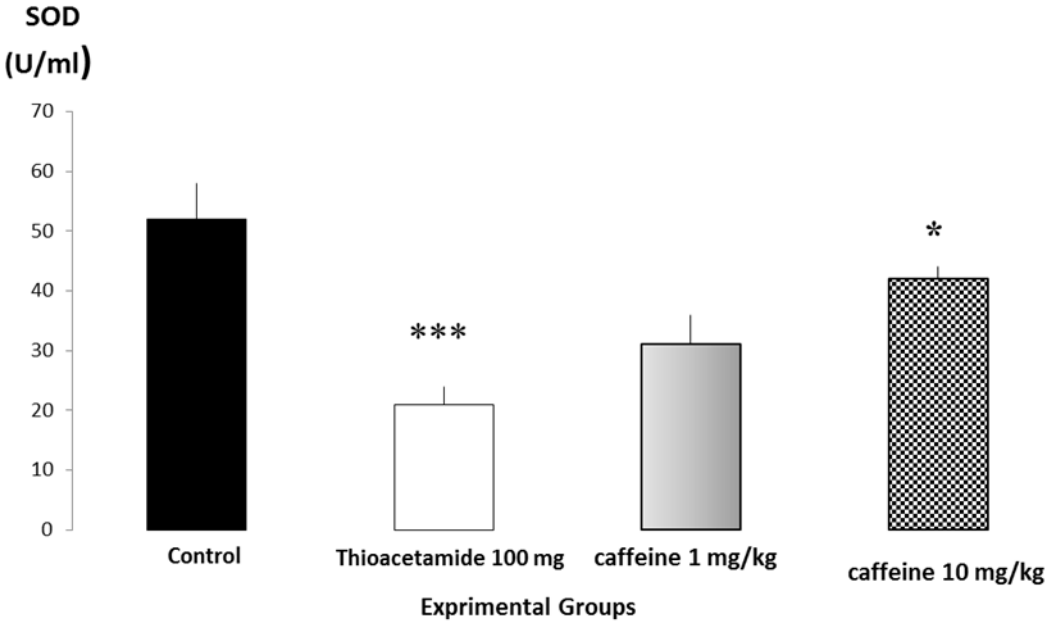
«نکروز»



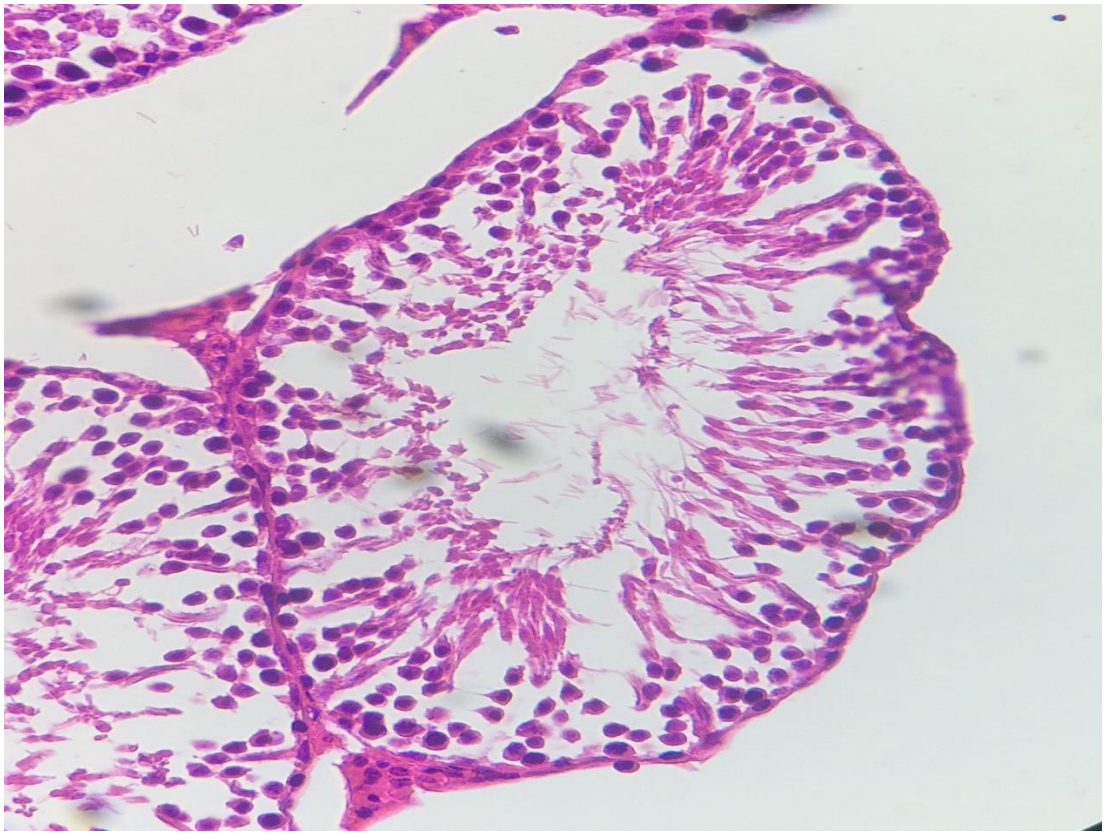
«اسیب شدید با تیواستامید»

2-1-4- نتایج سنجش سوپر اکسید دیس موتاز (SOD) در سرم

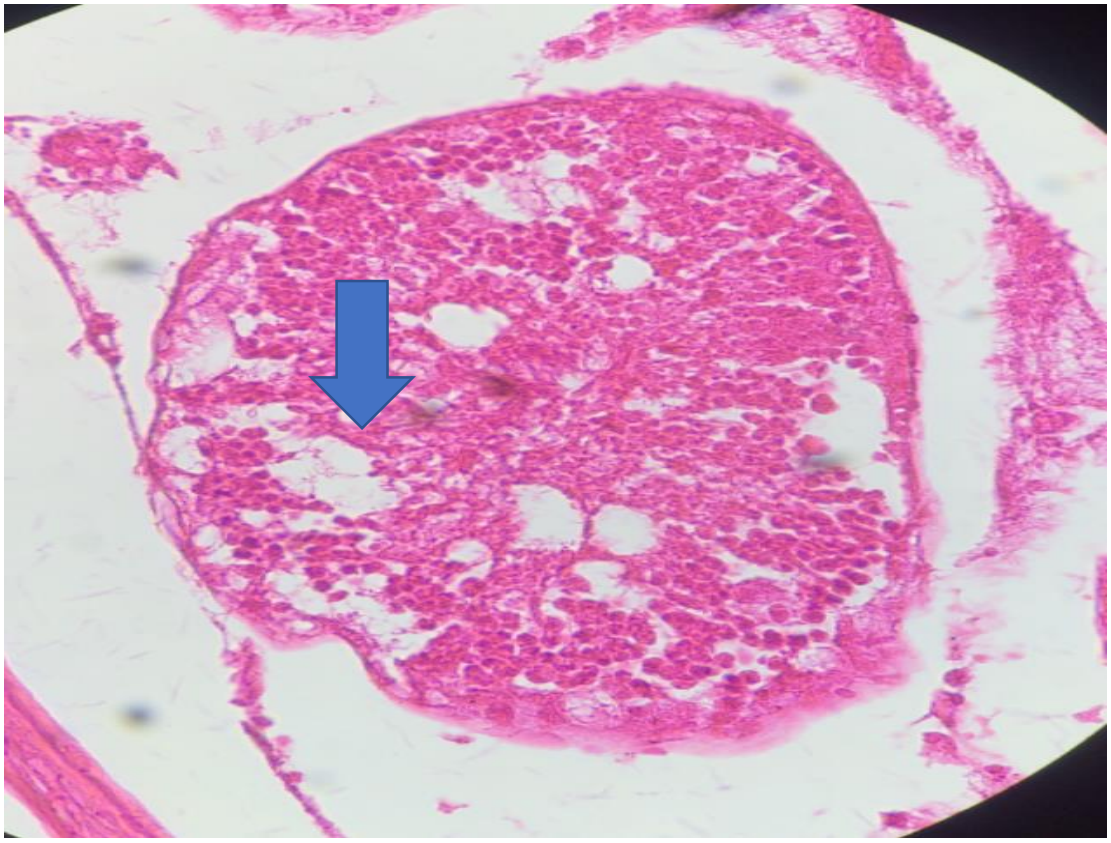
پس از اینکه نمونه‌ها در میکروپلیت ریخته شـد و خوب مخلوط شـد و در زمان‌های صـفر و 2 دقیقه تو سط د ستگاه الایزا ریدر در طول موج 420 nm قرائت شد و میزان فعالیت SOD مطابق فرمول محا سبه گردید که میانگین آن‌ها در شکل 2-4 مشاهده می شود. همانگونه که نتایج نشان می‌دهد گروه تیمار شده با تویا ستامید پایین ترین سطح SOD را دارد، بدین معنی که تزریق این ماده موجب کاهش معنی داری ($p<0/05$) در سطح SOD در موش‌های مورد مطالعه گردیده است، مطابق نتایج مشاهده می شود با افزایش میزان کافئین در نمونه ها شاهد افزایش SODمی‌با شیم، همانگونه که مشـاهده می‌شـود گروه تحت تیمار با کافئین در سـطح بالاتری و بطور معنی داری ($p<0/01$) با گروه تیمار شده با تیواستامید می‌باشند. بدین ترتیب می‌توان گفت تیواستامید موجب کاهش معنی داری در فعالیت SOD سرم در خرگوش سفید نیوزلندی گردیده و افزودن کافئین به میزان 10mg/kg تاثیر معنی داری در افزایش فعالیت SOD دارد.



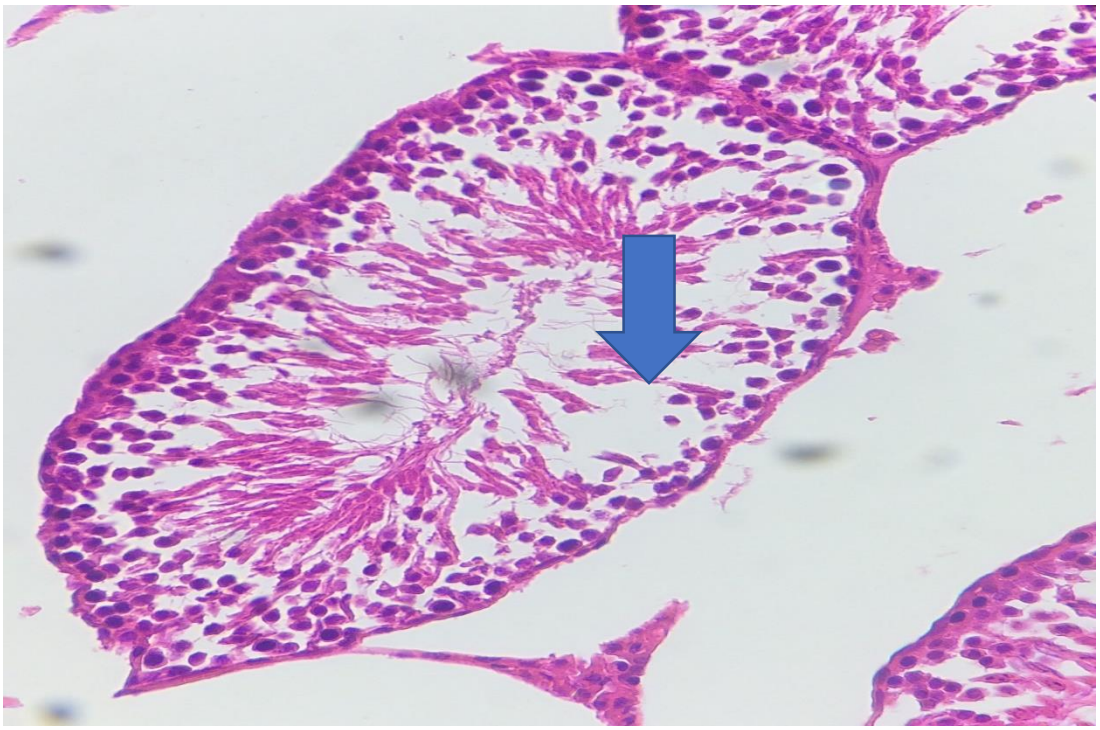
شکل 2-4- نتایج سنجش سوپر اکسید دیس موتاز سرم در خرگوش سفید نیوزلندی



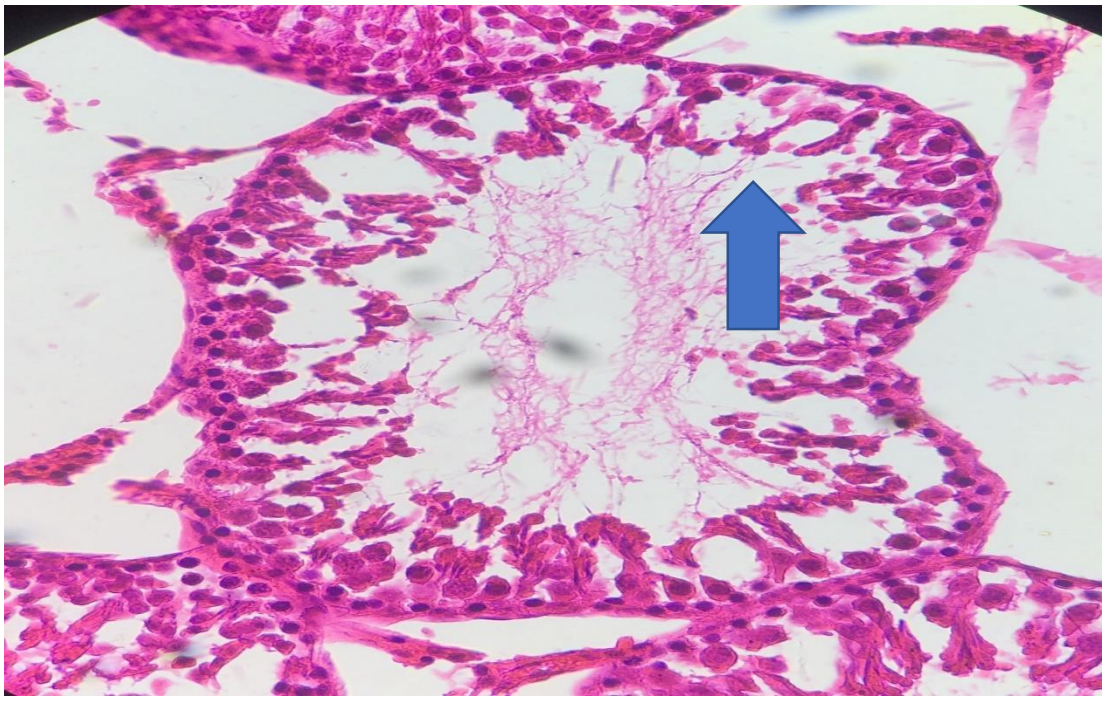
«سلول سالم»



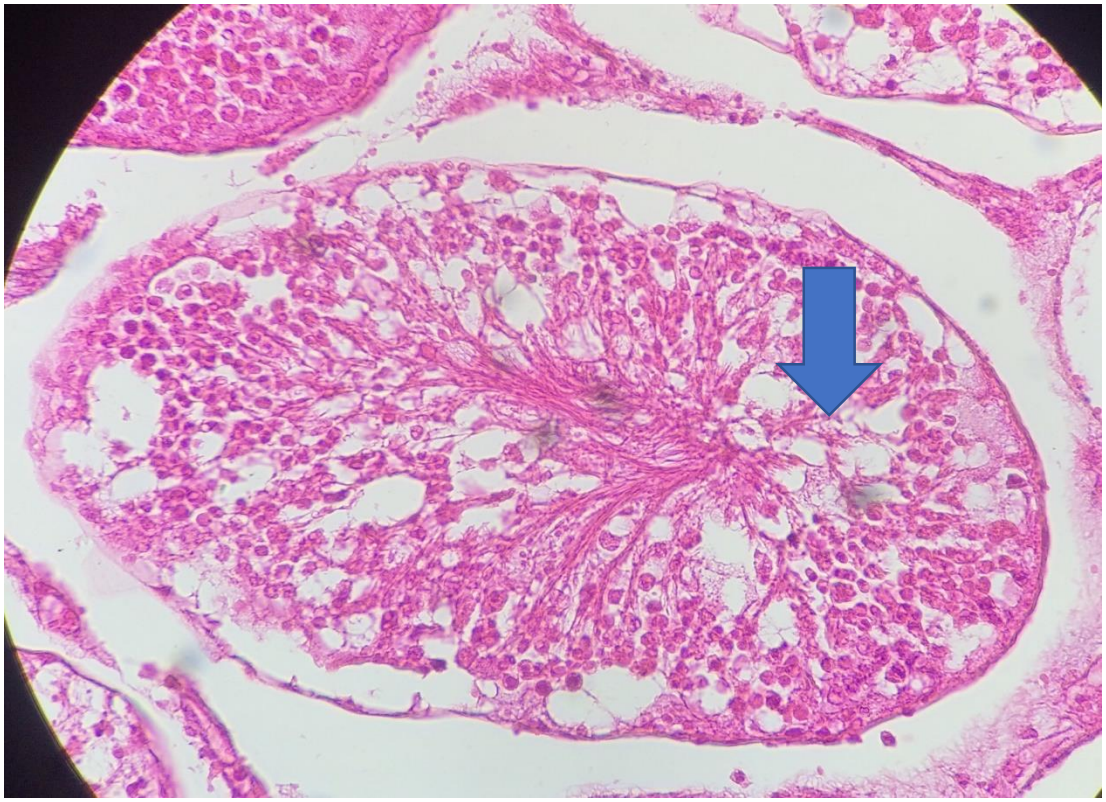
«کافیین با دوز 1 میلی گرم»



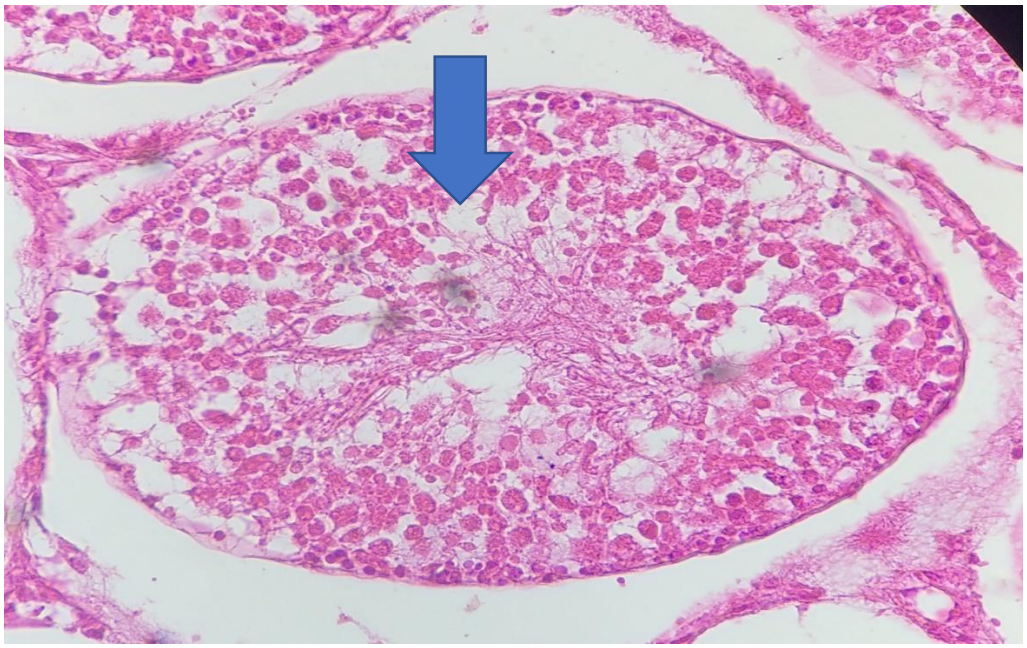
«کاهش سلولی کافیین با دوز 10»



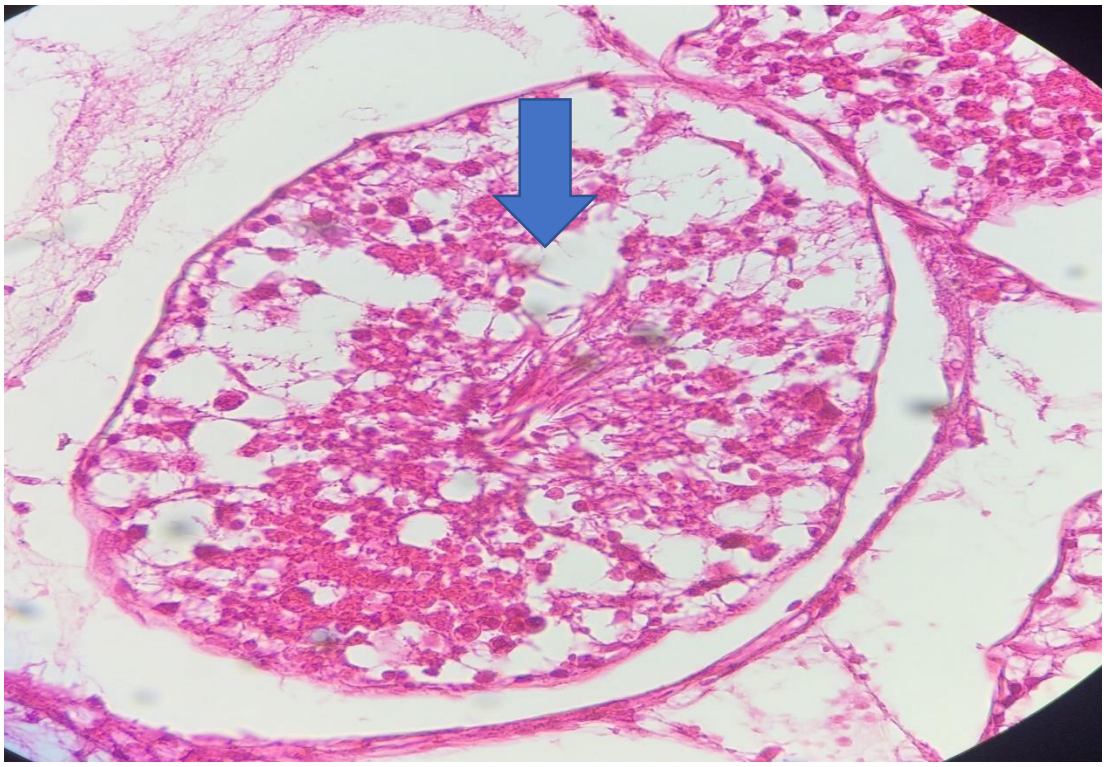
«کاهش سلولی»



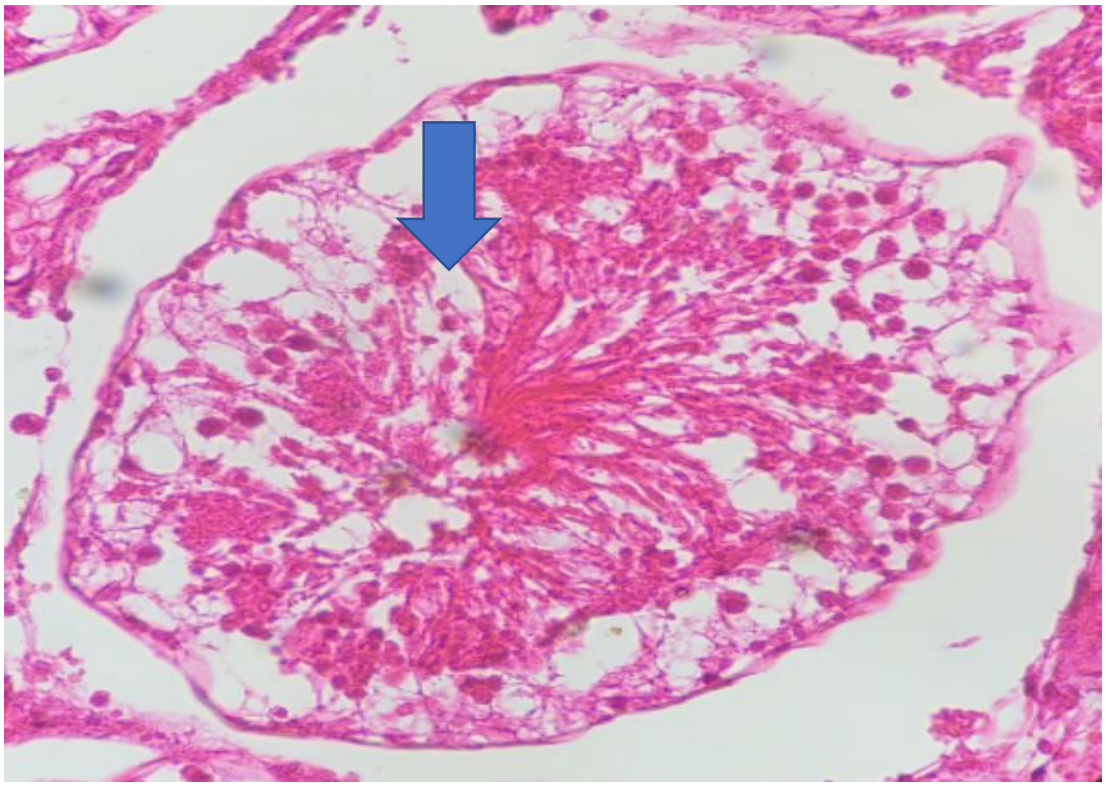
«اسیب شدید و تغییر واکویلازیسیون»



«کافیین با دوز 1 میلی گرم-اسیب شدید»



«نکروز»

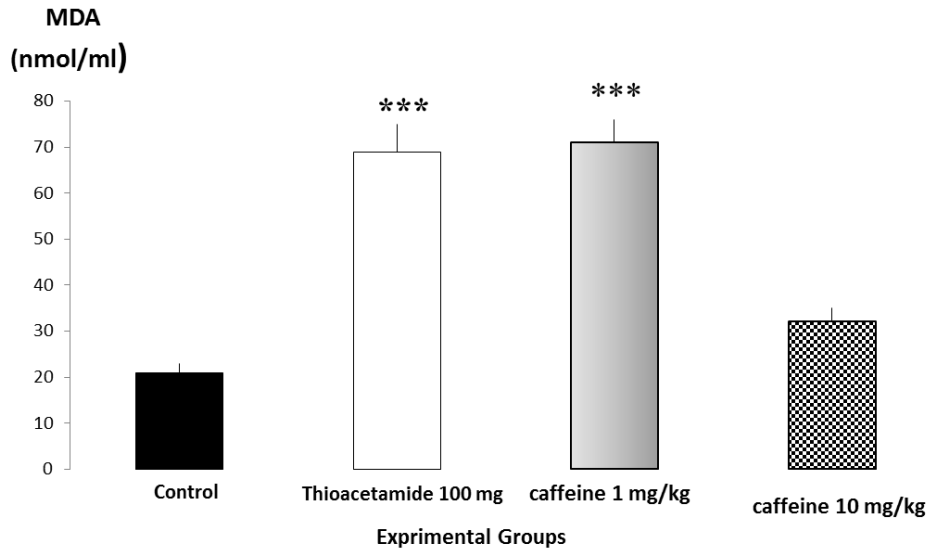


«اسیب شدید با تیواستامید»

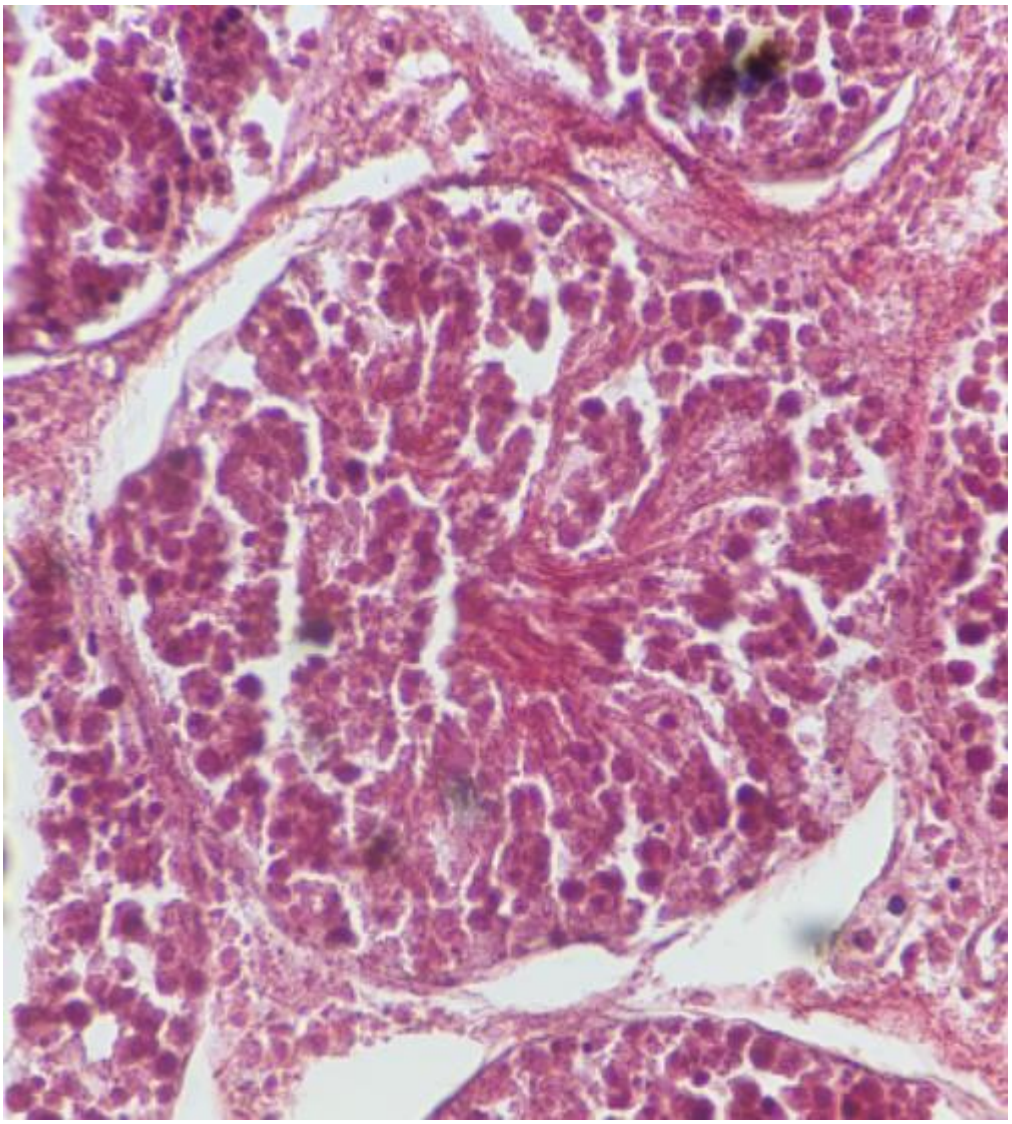
4-1-3- نتایج سنجش مالون دی آلدئید (MDA) در سرم

همانگونه که نتایج نشان می‌دهد بین گروه‌های تیمار شده با کافئین 1mg/kg و تیوا ستامید با سایر گروه های مورد مطالعه از لحاظ میزان سطح مالون دی آلدئید تفاوت معنی داری وجود دارد

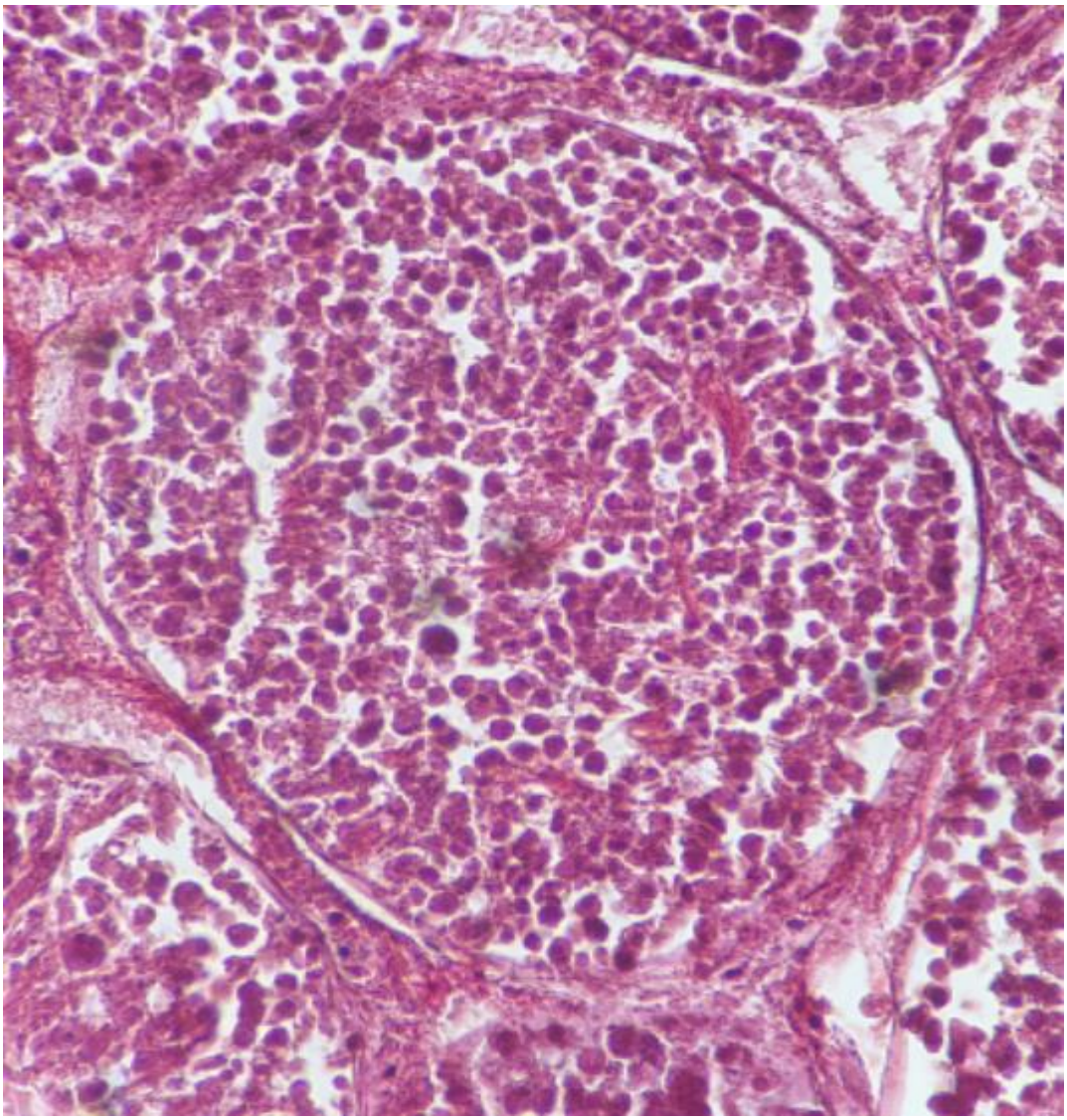
(p<0/01). می‌توان گفت بالارفتن سطح MDA تحت تاثیر تیوساتامید قرار گرفته و موجب افزایش میزان MDA در سرم خرگوش های مورد مطالعه شده است، از طرفی دیده میشود که کافئین به میزان 10mg/kg موجب پایین آمدن فعالیت MDA سرم در خرگوش سفید نیوزلندی شده است.



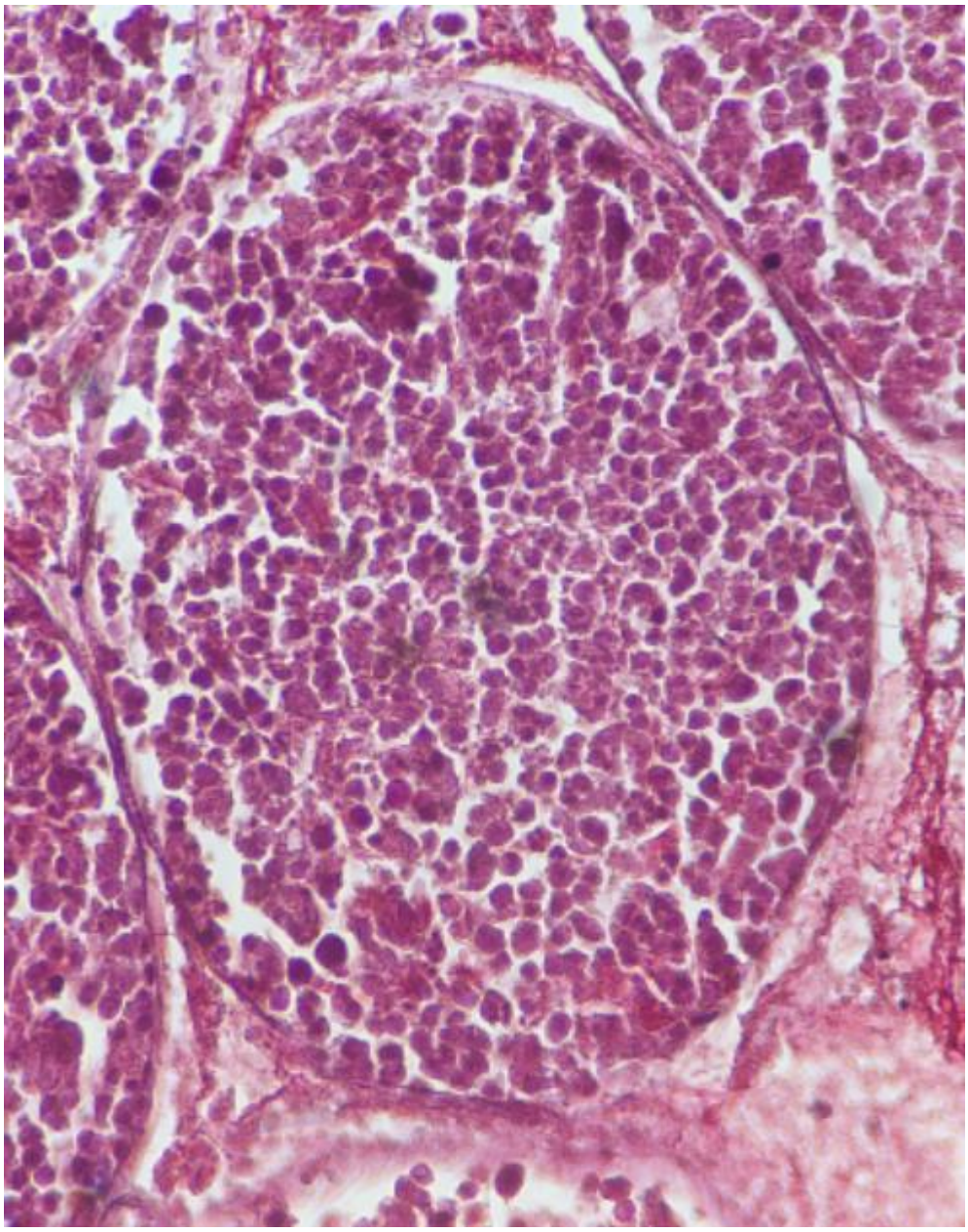
شکل 3-4- نتایج سنجش مالون دی آلدئید سرم در خرگوش سفید نیوزلندی



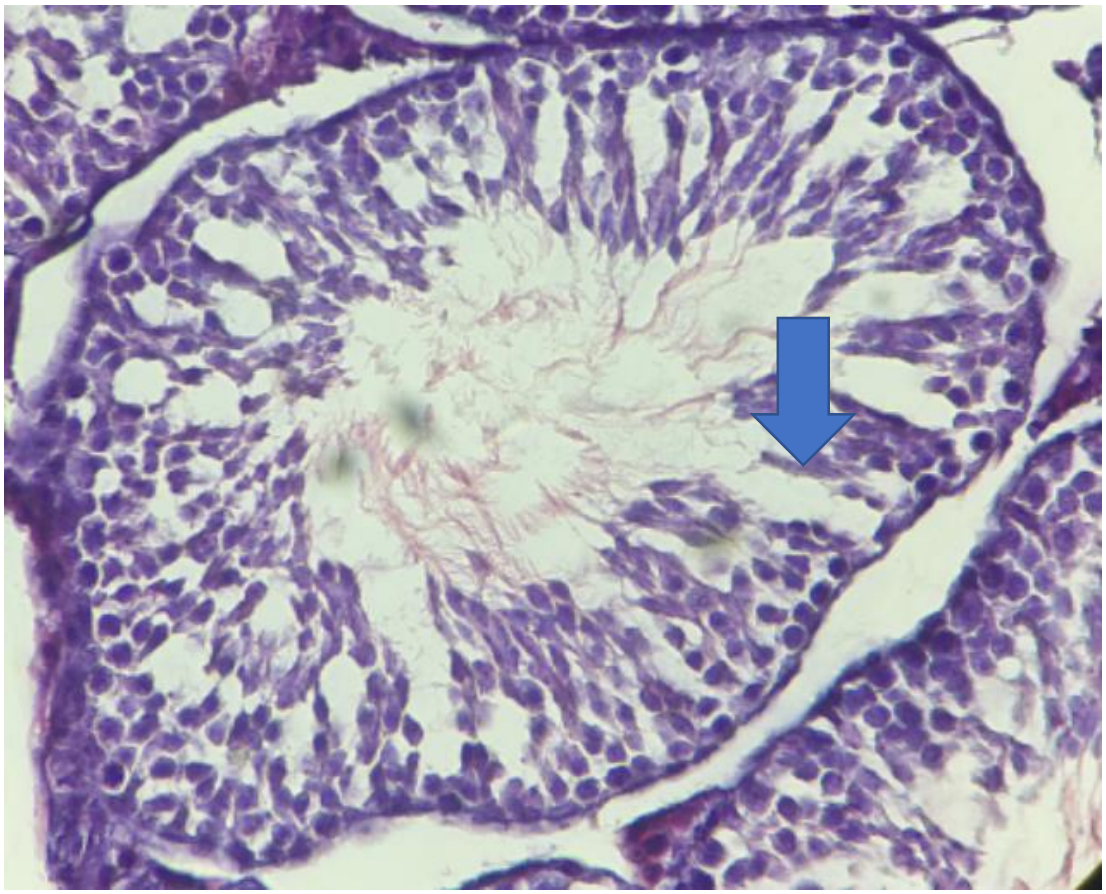
«بیضه-حالت طبیعی»



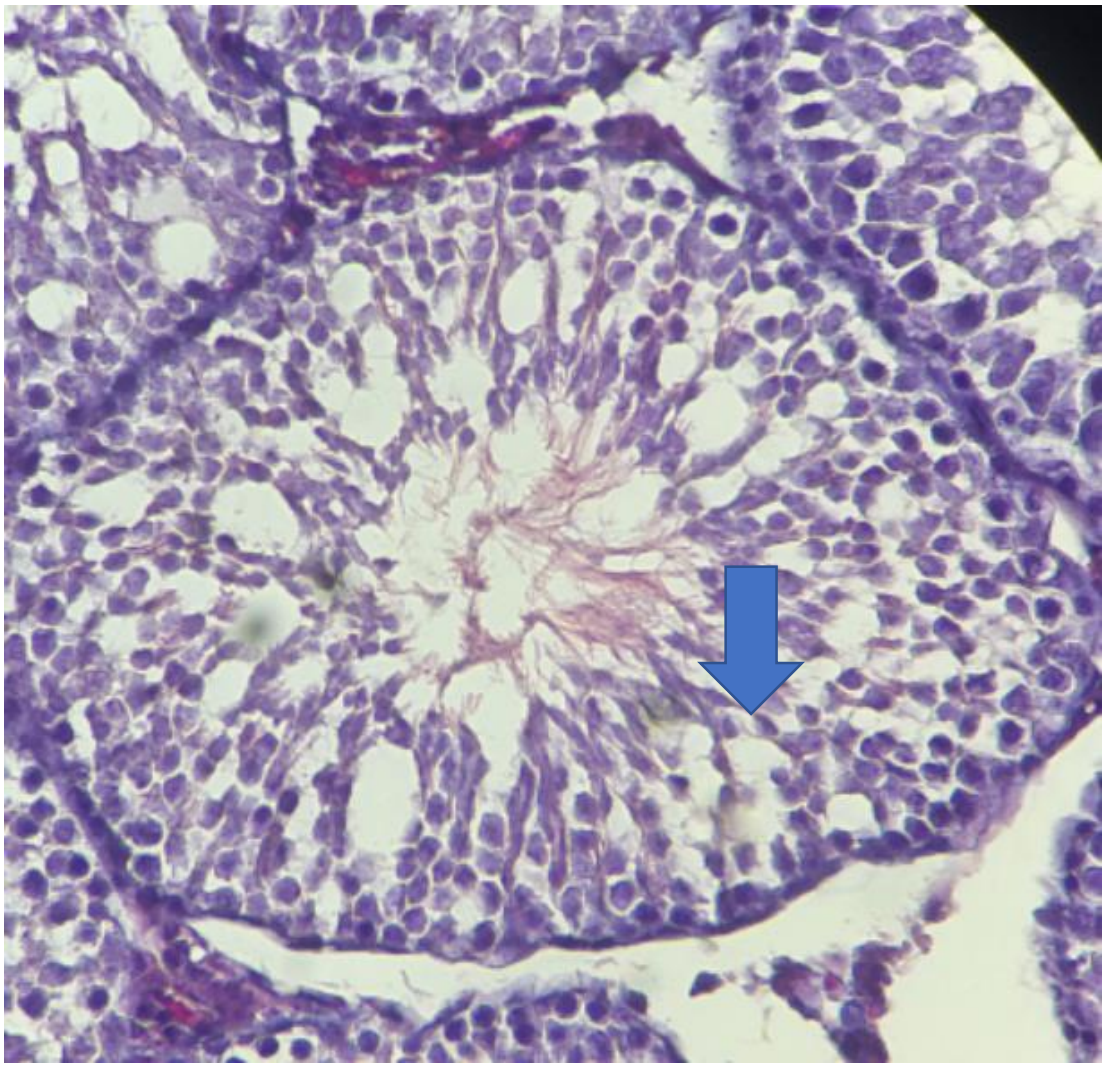
«بیضه-حالت طبیعی»



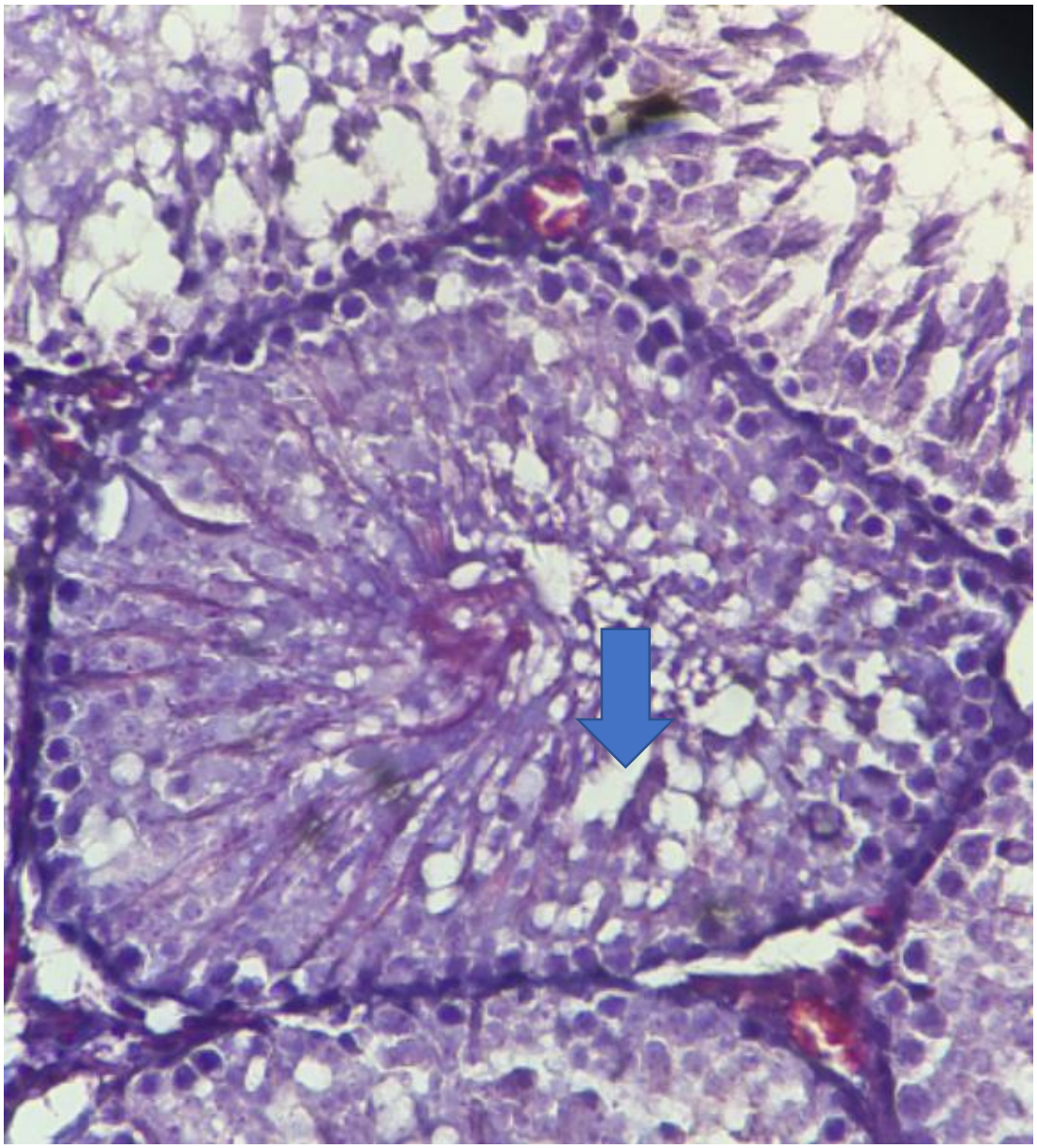
«بیضه-حالت طبیعی»



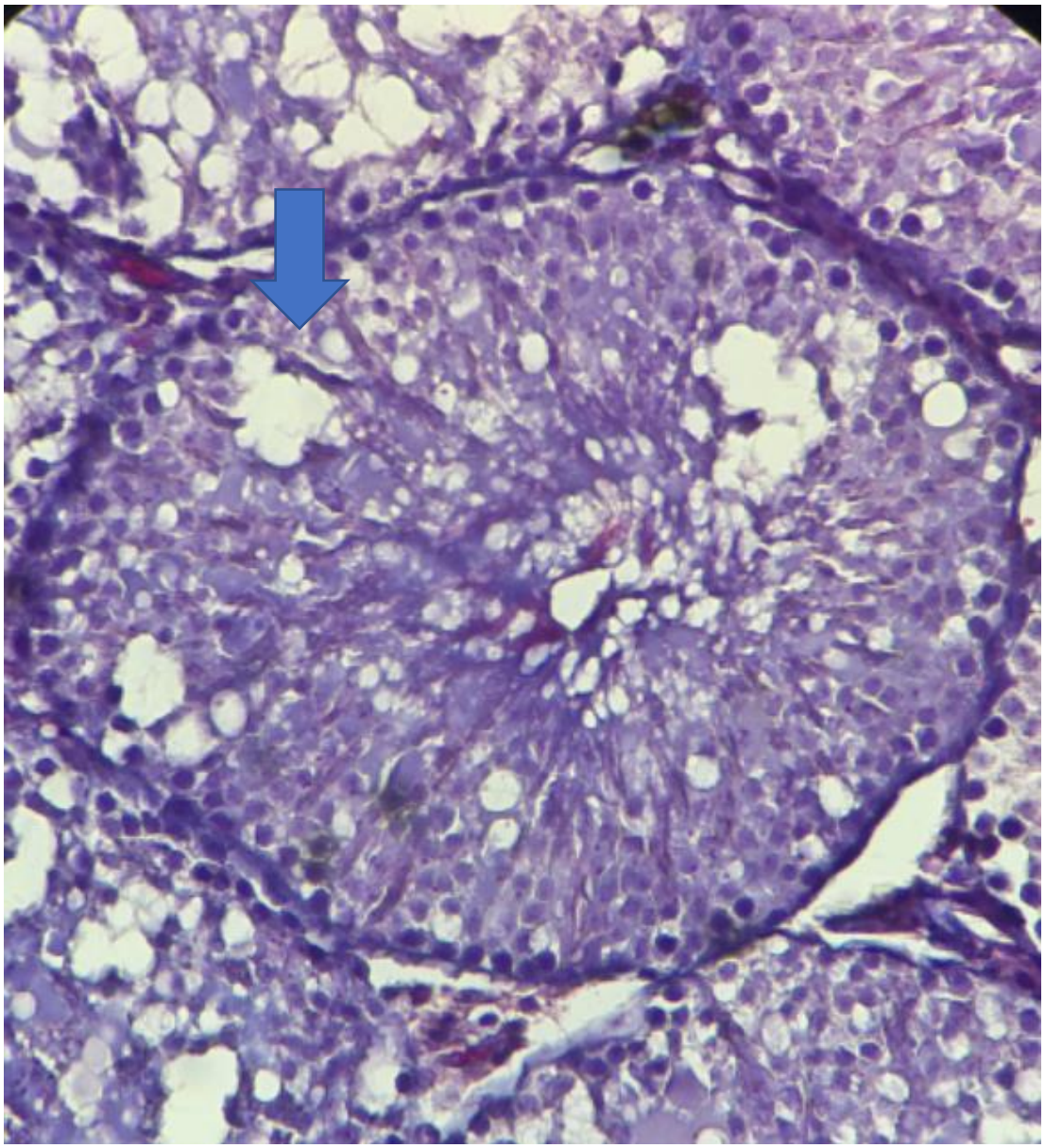
«کاهش جزیی سلول ها»



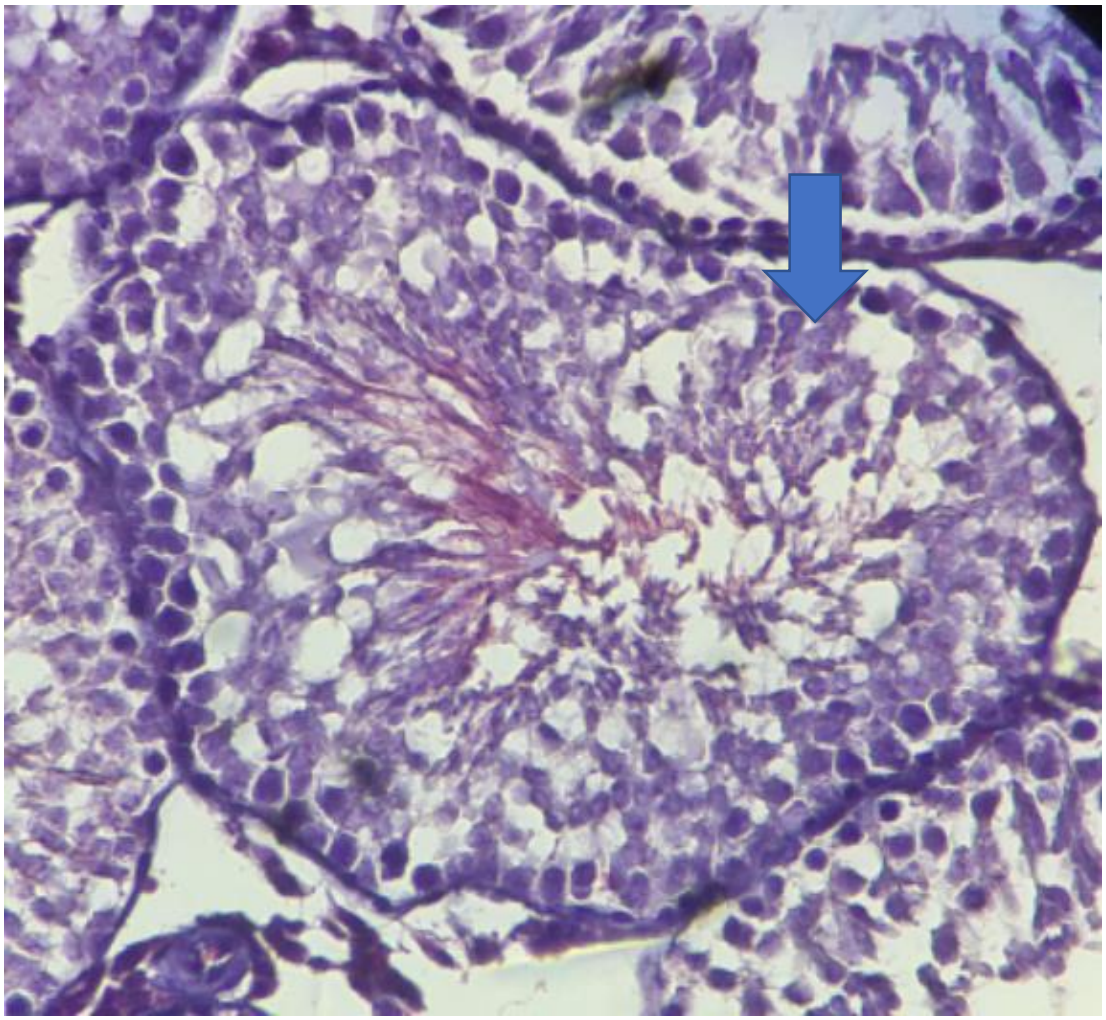
«کاهش جزیی سلول ها»



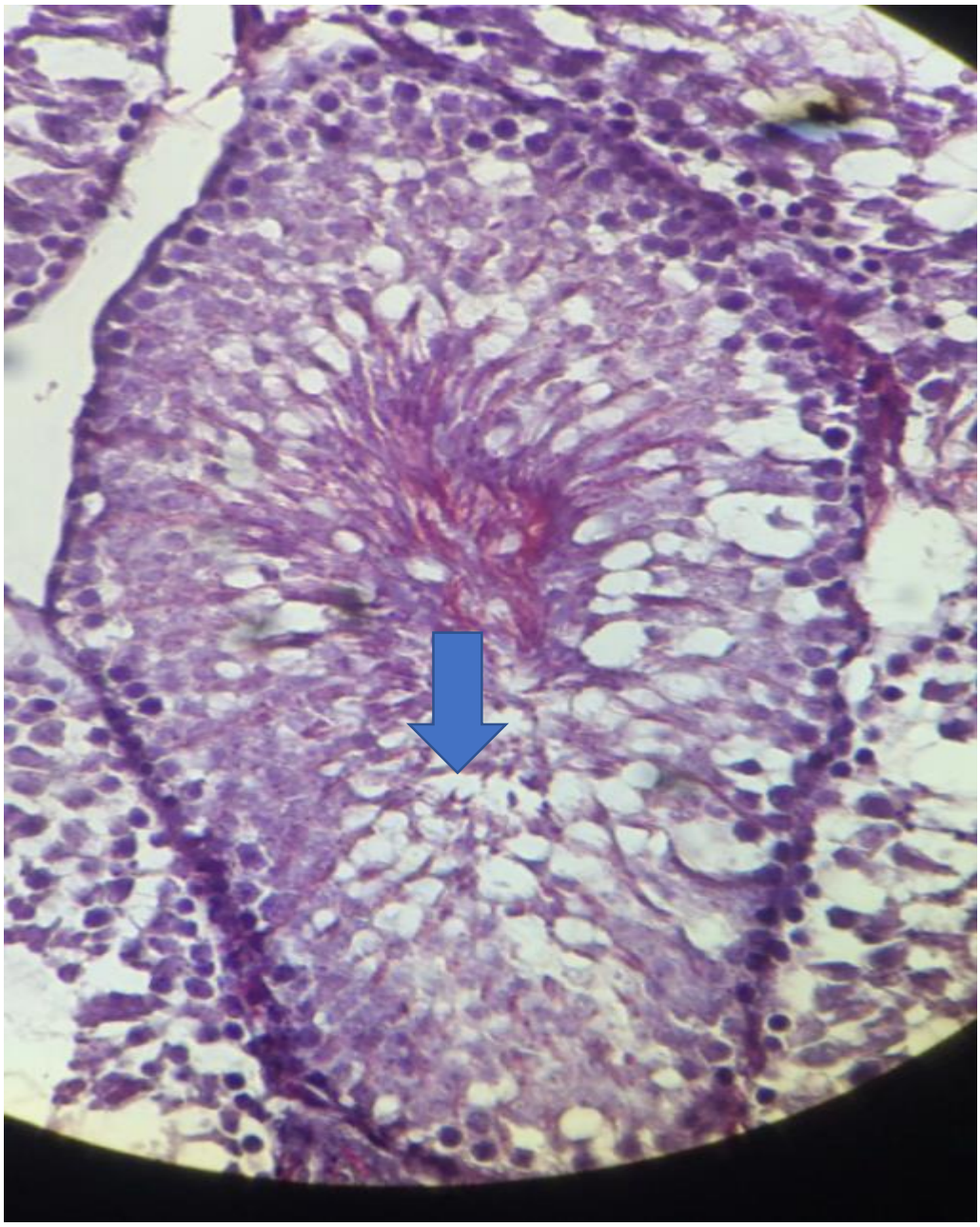
«کاهش سلول ها و نکروز سلول ها»



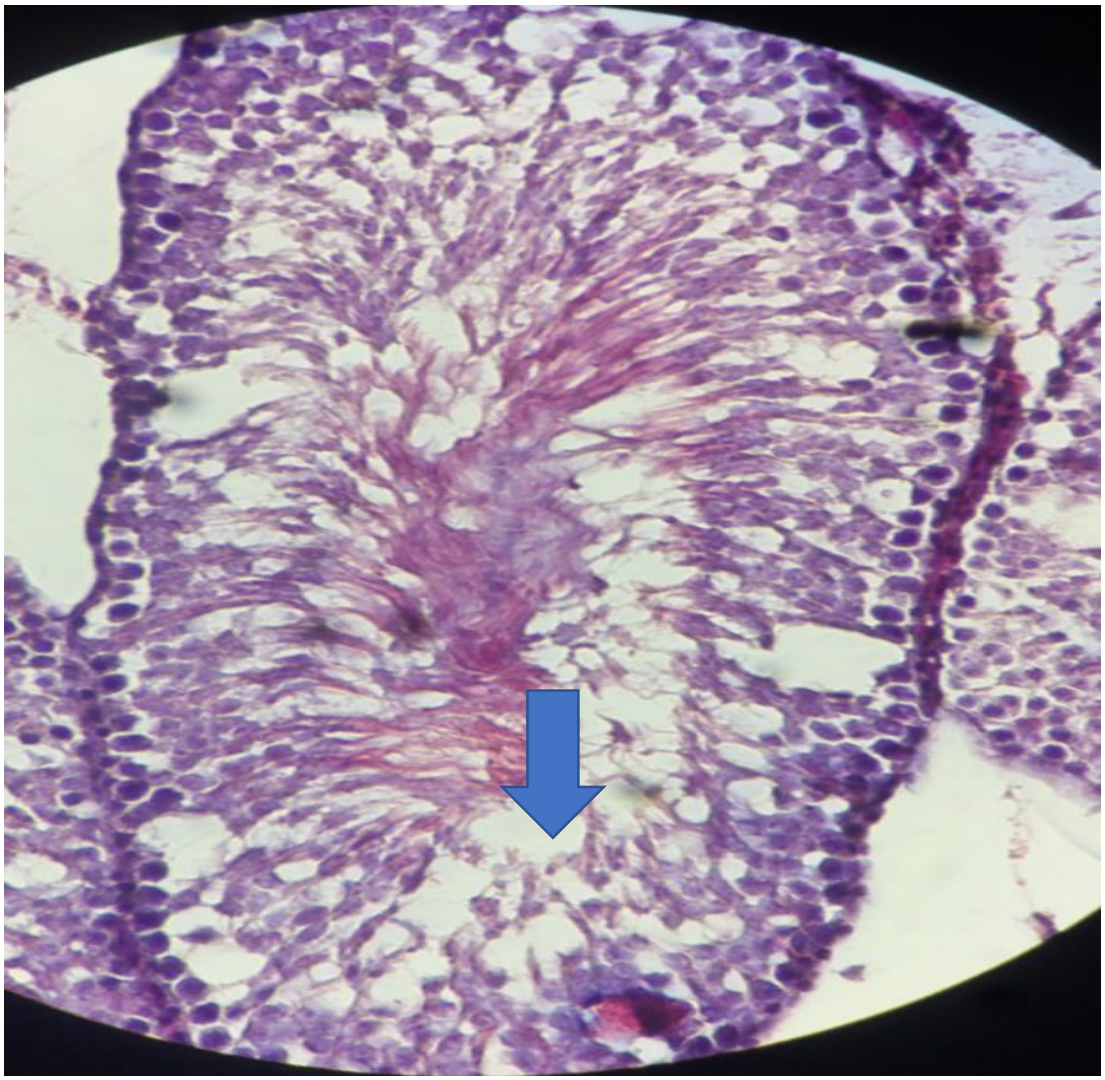
«نکروز سلول ها و کاهش تعداد سلول ها»



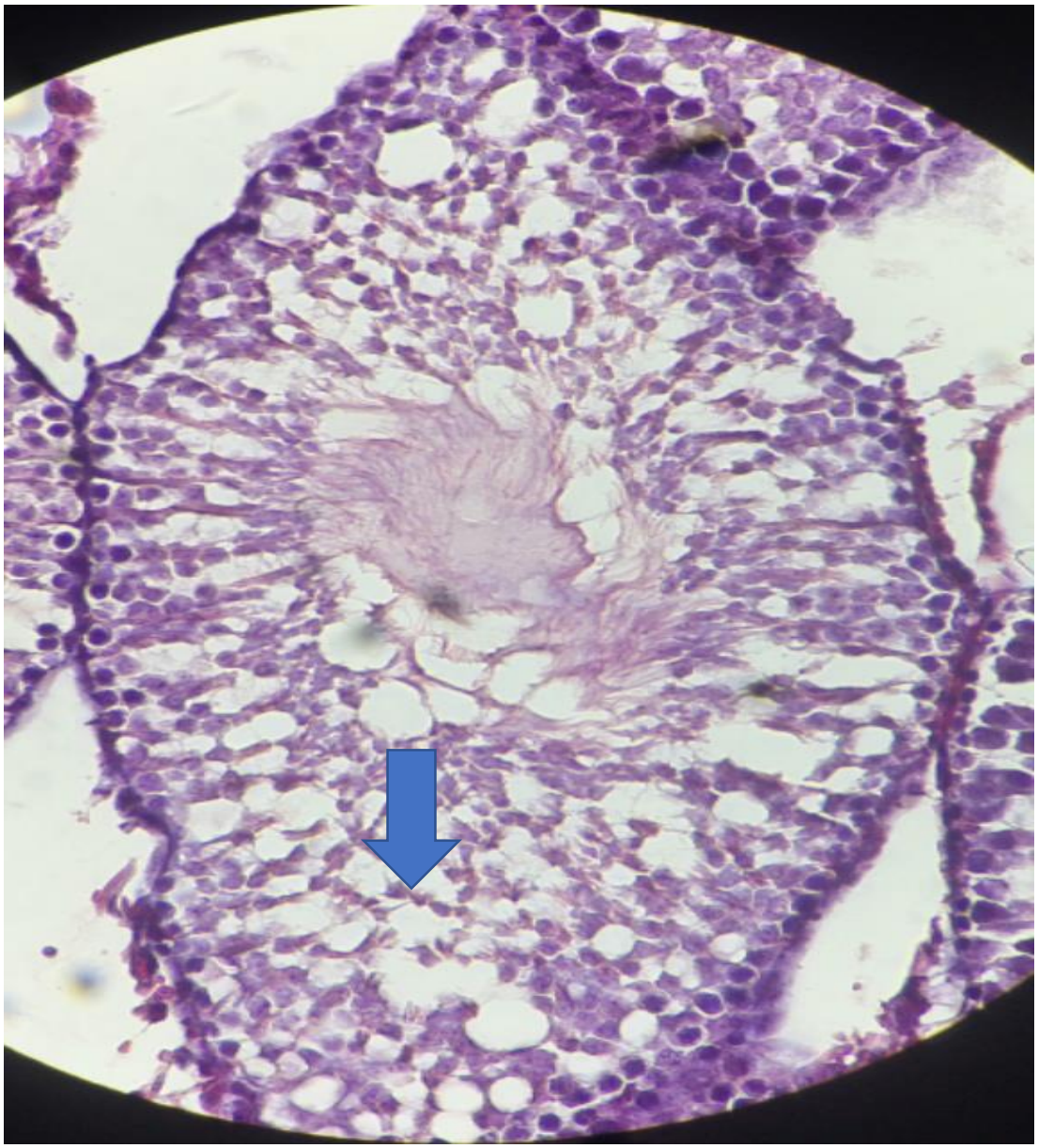
«نکروز سلول ها و کاهش تعداد سلول ها»



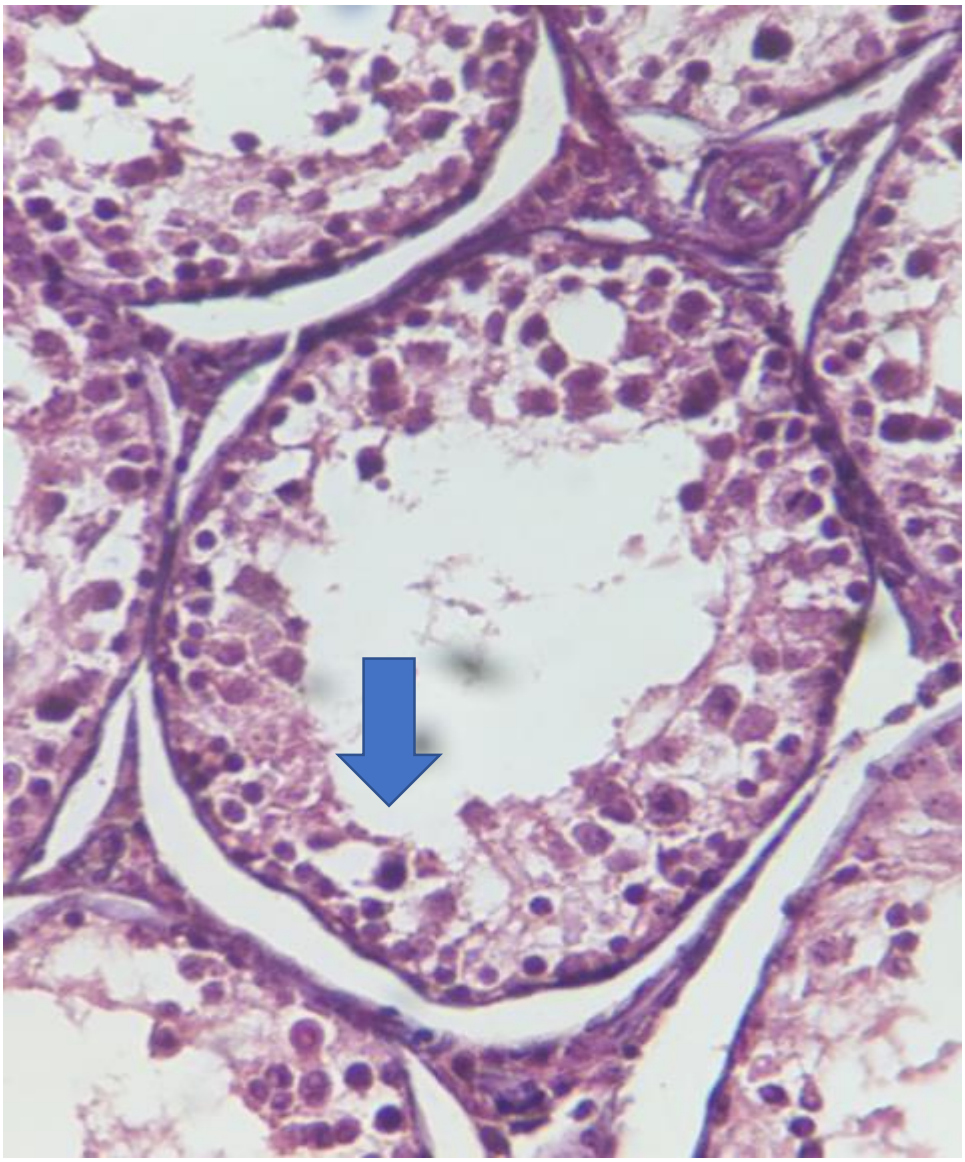
«نکروز سلول ها و کاهش سلول ها و از بین رفتن سلول ها»



«نکروز سلول ها و کاهش متوسط سلول ها و از بین رفتن سلول ها»



«نکروز سلول ها و کاهش شدید سلول ها و از بین رفتن سلول ها»



«نکروز سلول ها و کاهش شدید سلول ها»

«نکروز شدید سلول ها و کاهش شدید سلول ها»

4-2- بحث

تیواستامید یک ماده شیمیایی است که بطور معمول به عنوان کشنده قارچها و یک سم قوی کبدی به کار می رود. تیواستامید یک سوبسترای نفروتوکسیک قوی است و باعث ایجاد اختلال درعملکرد لیپیدی می گردد. تیواستامید توسط سیستم اکسیداز به متابولیتهای سمیاش Sulfene متابولیزه می شود که سپس در میان چندین اندام ازجمله پلاسما، کبد، کلیه، مغز استخوان، آدرنال و دیگر بافت ها پخش می شود. تیواستامید تحت یک متابولیسم گسترده به استات تبدیل می شود و از طریق ادرار در دوره 24 ساعته دفع می‌گردد (Kuramochi *et al*., 2016). تیواستامید یک ترکیب ارگانوسولفور است و یکی از چند عاملی است که تولید نکروز سنتری لوبولار در کبد می کند (Koblihová et al., 2014). اثرات تیواستامید محدود به کبد نمی باشد بلکه ممکن است به دیگر بافتها نیز توسعه یابد و تغییرات عملکردی و ساختاری فراوانی در تیموس، کلیه ها، روده، طحال و ریه‌ها ایجادکند پاسخ ماهیان به آلاینده‌ها به‌منظور آداپته شدن یا تغییر با شرایط متابولیک ایجاد می‌شود.

نتایج نشان داد که تیواستامدی موجب کاهش سطح کاتالاز در نمونه های مورد مطالعه گردید و تیمار حاوی کافئین توانست تا حد زیادی بر افزایش فعالیت کاتالاز در بین نمونه های مورد مطالعه تاثیر گذار باشد.

بنظر می‌رسد ورود تیواستامید به بدن خرگوش‌های نیوزلندی مورد مطالعه باعث به افزایش میزان ROS ها در خون خرگوش‌ها شده و در ادامه به‌منظور حذف ROS ها فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در نمونه های مورد مطالعه افزایش داشته. کاهش میزان فعالیت کاتالاز در خرگوش‌های نیوزلندی مواجهه شده با تیواستامید و کافئین متاثر از افزایش دوز تیمارهای اعمال شده بوده است. تحقیقات مشابهی نتایج این پژوهش را تایید می کنند، ازجمله افزایش میزان فعالیت کاتالاز در ماهی زبرا (*Danio rerio*) در اثر مواجهه با سه داروی دیکلوفناک، اتانول و

کتوتیفن گزارش‌شـــده اســـت. در چند مطالعه بر روی بافت کبد*Hoplias malabaricus* ماهی مشاهده شد که اثر دیکلوفناک باعث به بالارفتن میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گردیده در مقابل، مواجهه ماهی *Rhamdia quelen* با دیکلوفناک، باعث به پایین آمدن میزان فعالیت کاتالاز و ســـوپراکســـیداز در بافت کبد گردید (Saucedo - Vence *et al*., 2015; Nava alvarez *et al*., 2014; Praskova *et al*., 2014; Guiloski *et al*., 2015; Islas- Flores *et al*., 2013).

نتایج بررسی سوپر اکسید دیس موتاز حاکی از آن بود که گروه تیمار شده با تیواستامید پایین ترین سطح SOD را دارد و با افزایش سطح کافئین شاهد افزایش فعالیت این آنزیم در سرم خون خرگوشهای مورد مطالعه بودیم.

آنزیم SOD یک آنتی‌اکسیدان قوی شناخته می شود این آنزیم نقش موثری در حذف رادیکال‌های آزاد دارد. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اولین خط دفاعی در مقابل تاثیرات مضر رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها شناخته می شود و با حذف رادیکال سوپراکسید، سلول‌ها را از آسیب‌های غشایی محافظت می‌نماید (Braydich-Stolle et al., 2005).

درشرایط فیزیولوژیکی ، سوپراکسید دیسموتاز یک آنزیم تاثیر گذار در سیستم دفاعی می‌باشد،که ضمن تبدیل رادیکال های آزاد به مواد کم خطر و تولید پراکسید هیدروژن، نقش مهمی در کاهش آسیب های ناشی از استرس‌اکسیداتیو دارد (Kono and Fridovich, 1982)(Matés, 2000).

در تحقیقات انجام‌شـــده توســـط Blanco و همکاران و همچنین Patra و همکاران بیان شـــد که از شواهد مهم وجود پراکسیدا سیون، افزایش MDA و کاهش فعالیت SOD ا ست (Blanco et al., 2007)(Patra et al., 1999) که با نتایج حاصل از این پژوهش همخوانی دارد.

نتایج نشان داد MDA تحت تاثیر تیو ساتامید افزایش معنی‌داری دا شته از طرفی دیده شد که کافئین به میزان 10mg/kg موجب پایین آمدن فعالیت MDA ســـرم خون در خرگوش ســـفید نیوزلندی گردید. در همین راســـتا محمدپورزه‌آب و همکاران (1396) در بررســـی اثر عصـــاره‌ی

هیدروالکلی دانه‌ی جغجغه بر آسیب حاد کبدی ناشی از تیواستامید در موش صحرایی ابزاز داشتند مقدار مالون دیآلدئید در گروه شاهد منفی، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد. درمان با عصارهی جغجغه، سبب کاهش معنی‌داری در میزان مالون دی‌آلدئید در گروه مورد شد. همچنین، مالون دیآلدئید سرم گروه شاهد منفی، به طور معنی‌داری بالاتر از گروه مورد بود، که با نتایج حاصل از این پژوهش همخوانی دارد، می‌توان گفت کافئین توانسته موجب بهبود اثرات مخرب ناشی از تیواستامید در خرگوش‌های نیوزلندی گردد.

مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز هستند که وظایف هر کدام به‌صورت ذیل می باشد. کاتالاز باعث تجزیه پراکسید هیدروژن به مولکول اکسیژن و آب می‌شود. سوپر اکسید دیسموتاز سبب تجزیه سوپر اکسیدها به پراکسید هیدروژن می‌شود و گلوتاتیون پراکسیداز به همراه گلوتاتیون اکسیداز سبب کاهش هیدرو پراکسیداز چربی و پراکسید هیدروژن می‌شود (Martineez - Alvarex *et al*., 2005). هنگامی که استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد، بسیاری از آنیون‌های سوپر اکسید رها شده در داخل سلول به مولکول‌های پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود که این مولکول‌ها توسط کاتالاز از بین می‌روند. سوپر اکسید دیسموتاز نیز همانند کاتالاز یک آنزیم محرک است و اکسیژن فعال موجب کاهش آن می شود. وقتی ارگانیسم ها در معرض آلاینده هاقرار می گیرند، سیستم ROS فعال می شود و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بخصوص سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز افزایش می یابد (Niyogi *et al*., 2001). با افزایش آلاینده‌ها، افزایش شدید میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در ماهی کپور معمولی مشاهده می‌گردد، هر چند نحوه پاسخ بافت‌های مختلف ماهی به میزان آلودگی متفاوت است و ممکن است یک بافت به استرس اکسیداتیو پاسخ ندهد و سیستم آنزیمی بخوبی فعال نشود و درنتیجه تخریب بافتی بیشتر باشد (Yilmaz *et al*.,).

(2006 ولی در این پژوهش مشـاهده شـد که فعالیت آنزیم‌های کبدی در تیماهای مورد اسـتفاده کافئین بطور معنی داری منجر به بهبود این فعالیت‌ها در نمونه های مورد مطالعه گردید.

نتیجه گیری:

پژوهش حا ضر با هدف برر سی اثر نانوامولسیون کافئین بر ا سیب نا شی از تیوا ستامید در بافت بیضه خرگوش و نیز مقایسه اثر آنها بر روی شاخص‌های استرس اکسیداتیو صورت پذیرفت. نتایج نشـان داد تیواسـتامید بطور معنی داری موجب کاهش فعالیت کاتالاز و سـوپر اکسـید دیس موتاز گردید و در از طرفی منجر به کاهش سـطح مالون دی آلدئید در سـرم خون نمونه‌ها گردید، در مقابل کاربرد کافئین موجب بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی گردید. با توجه به نتایج انتظار می رود م صرف کافئین به میزان کافی سبب بهبود آ سیب های وارده نا شی از تیوا ستامید در بافت بیصه گردد.

پیشنهادات

با توجه به نتایج حا صل از این پژوهش و وجود خواص آنتی‌اک سیدانی در نانوامول سیون کافئین پیشنهاد میشود اثرات آنتی اکسیدانی کافئین را بر سایر بیماری های مرتبط با استرس اکسیداتیو بررسی شود.

بررسی تاثیر نانوامولسیون کافئین بر سایر حیوانات آزمایشگاهی از جمله موش.

پیشنهاد می‌شود تاثیر نانوامولسیون کافئین بر استرس اکسیداتیو برخی دیگر از اندام‌ها از قبیل کبد و طحال بررسی گردد.

منابع

منابع

حاجی نژاد، م.، و بامری، ص.، و بیضـانی، ح.، و سـام زاده کرمانی، ع. 1398. بررسـی اثر تجویز طولانی‌مدت نانو ذرات نیکل اکسید (Nio) سنتز شده به روش سبز بر هیستوپاتولوژی کبد، کلیه و بیضـه‌ی موش صـحرایی. *مجله دانشـکده پزشـکی اصـفهان*، 37(550): 1226-1232.

حاجی نژاد، م.، و سـام زاده کرمانی، ع. 1398. بررسـی هیسـتوپاتولوژیک اثر تجویز داخل صـفاقی نانوترکیب پلی آنیلین/منیزیم اکسـید در بافته‌ای کبد و کلیه‌ی موش‌های صـحرایی. *مجله دانشکده پزشکی اصفهان*، 37(517): 144-138.

محمد پور زه آب، م، شـریعتی شـریفی، ف، جمشـیدیان، ع، حاجی نژاد، م. ر. 1397. اثر ع صاره دانه کهورک بر ا سترس اک سیداتیو نا شی از تیوا ستامید در موش صحرایی. *دوماه نامه علمی ـ پژوهشی فیض*. ۲۲ (۱) :۳۰-۲۵.

نوروزی، ا. و شریعتی، م. 1399. اثر حفافظتی ویتامین D بر اسپرماتوژنز و تغییرات بافت‌شناسی بیضه موش‌های صحرایی بالغ تیمار شده با تیوا ستامید. *نشریه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز*. ۹ (۲) :۱۲۲-۱۰۷.

Adebayo, J.O., Akinyinka, A.O., Odewole, G.A. and Okwusidi, J.I. 2007. Effect of Caffeine on the Risk of Coronary Heart Disease – a Re-Evaluation, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22 (1): 29-32.

Ahn, H. Y. Karaki, H. and Urakawa, N. 1988. Inhibitory effects of caffeine on contractions and calcium movement in vascular and intestinal smooth muscle, British Journal of Pharmacology, 93(2): 267–274.

al'Absi, M., Lovallo, W.R., McKey, B., Sung, B.H., Whitsett, T.L. and Wilson, M.F. 1998. Hypothalamic-pituitaryadrenocortical responses to psychological stress and caffeine in men at high and low risk for hypertension. *Psychosomatic Medicine*, 60(4): 521-7.

Anton, N. and Vandamme, T.F. 2011. Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. *Pharmaceutical Research*, 28(5): 978–985.

Aro, A., Pietinen, P., Uusitalo, U. and Tuomilehto, J. 1989. Coffee and tea consumption, dietary fat intake and serum cholesterol concentration of Finnish men and women. *Journal of Internal Medicine*, 226(6): 127-32.

Battram, D.S., Arthur, R., Weekes, A., Graham, T.E. 2006. The glucose intolerance induced by caffeinated coffee ingestion is less pronounced than that due to alkaloid caffeine in men. *J Nutr*, 136: 1276–80.

Bech, B.H., Nohr, E.A., Vaeth, M., Henriksen, T.B., Olsen, J. 2005. Coffee and fetal death: a cohort study with prospective data. *Am J Epidemiol*, 62(10): 983-90.

Belali Kharaji, M., Yadegari, M., Anvari, M., Abbasi Sarcheshmeh, A. and Dortaj, H. 2019. Stereological Study on the Effects of Maternal Caffeine Consumption on Histomorphometric Changes of Testis and Prostate in Rat Offspring. *Mod Med Lab J*, 3(1): 20-33.

Blanco, A. et al. 2007. Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. Environmental Toxicology and Pharmacology, 23(1): 96–101.

Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J.J. and Hofmann, M.-C. 2005. In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline\rStem Cells. Toxicological Sciences, 88(2): 412–419.

Brent, R.L., Christian, M.S., Diener, R.M. 2011. Evaluation of the reproductive and developmental risks of caffeine. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 92(2): 152–87.

Buijsse, B., Weikert, C., Drogan, D., Bergmann, M., Boeing, H. 2010. Chocolate consumption in relation to blood pressure and risk of cardiovascular disease in German adults. *Eur Heart J*, 31: 1616–23.

Butcher, R. W. and Sutherland, E. W. 1962. Adenosine 3_, 5_- phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3_, 5_-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3_, 5_-phosphate in human urine, *The Journal of Biological Chemistry*, 237: 1244–1250.

Cinghita D., Radovan, C. and Dascalu, D. 2008. Anodic Voltammetry of Thioacetamide and its Amperometric Determination in Aqueous Media. *Sensors*, 8: 4560-4581.

Cooper, C, Atkinson, EJ, Wahner, HW, O'Fallon, WM, Riggs, BL, Judd, HL, *et al*. 1992. Is caffeine consumption a risk factor for osteoporosis?, *J Bone Miner Res*, 7: 465-71.

Dews, PB. 1982. Caffeine. Ann Rev Nutr, 2: 323-41.

Di Rocco, J.R., During, A., Morelli ,P.J., Heyden, M., Biancaniello, T.A. 2011. Atrial fibrillation in healthy adolescents after highly caffeinated beverage consumption: two case reports. *J Med Case Rep*, 5-18.

Dorostghoal, M., Majd, N.E. and Nooraei, P. 2012. Maternal caffeine consumption has irreversible effects on reproductive parameters and fertility in male offspring rats. *Clin Exp Reprod Med*, 39(4): 144.

Einother, SJ., Giesbrecht, T. 2013. Caffeine as an attention enhancer: reviewing existing assumptions. *Psychopharmacology (Berl)*, 225(2): 251–74.

Endo, M. 1977. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum, *Physiological Reviews*, 57(1): 71–108.

Galeone, C., Tavani, A., Pelucchi, C., Turati, F., Winn, D.M., Levi, F. 2010. Coffee and tea intake and risk of head and neck cancer: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(7): 1723-36.

Ghahremani, F. 2005. Factors affecting infertility in men. *Journal of Gorgan university of Medical Sciences.*7(2):42- 45.

Ghol, M.D., Moazedi, A.A. and Nooraei, P. 2011. Effects of Caffeine Consumption during Lactation on Postnatal Development of Testis in Offspring Wistar Rats. *Journal of Isfahan Medical School*, 28 (118): 11-19.

Golding, J. 1995.Reproduction and caffeine consumption–a literature review. *Early Hum Dev*, 43(1): 1–14.

Green MS, Harari G. 1992. Association of serum lipoproteins and health-related habits with coffee and tea consumption in free-living subjects examined in the Israeli CORDIS Study. *Preventive medicine*, 21(4): 532-45.

Grubben, M.J., Boers, G.H., Blom, H.J., Broekhuizen, R., de Jong, R., van Rijt, L., de Ruijter, E., Swinkels, D.W., Nagengast, F.M. and Katan, M.B. 2000. Unfiltered coffee increases plasma homocysteine concentrations in healthy volunteers: a randomized trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(2): 480-4.

Guerrero, A. Singer, J. J. and Fay F. S. 1994. Simultaneous measurement of Ca2+ release and influx into smooth muscle cells in response to caffeine. A novel approach for calculating the fraction of current carried by calcium. *Journal of General Physiology*, 104(2): 395– 442.

Guiloski, I.C., Ribas, J.L.C., Pereira, L.D.S., Neves, A.P.P. and Asis, H.C.S.D. 2015. Effects of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater. *Ecotoxicology and Enviromental Safty*, 114: 204-211.

Gutiérrez, J.M. et al. 2008. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 13(4): 245–251.

Happonen, P., Voutilainen, S., Salonen, J.T. 2004. Coffee drinking is dose-dependently related to the risk of acute coronary events in middle-aged men. *Journal of Nutrition*, 134(9): 2381-6.

Hughes, A. D., Hering, S. and Bolton, T. B. 1990. The action of caffeine on inward barium current through voltage-dependent calcium channels in single rabbit ear artery cells, *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 416 (4): 462– 466.

Huxley, R.R., Neil, H.A. 2003, The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr*, 57: 904–8.

Islas-Flores, H., Gomez-Olivan, M., GalarMartinez, M., Colin-Cruz, A., Neri-Cruz, N. and Garcia-Medina, S. 2013. Diclofenac- induced ixidative stress in brain,liver, gill, and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Enviroment Safty*, 92: 32-38.

Jafari, S.M., He, Y. and Bhandari, B. 2007. Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *Journal of Food Engineering*, 82(4): 478–488.

Jafari, S.M., He, Y. and Bhandari, B. 2007–a. Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *Journal of Food Engineering*, 82(4): 478–488.

James, J.E. 1994. Chronic effects of habitual caffeine consumption on laboratory and ambulatory blood pressure levels. Journal of Cardiovascular Risk, 1(2): 159-64.

Jee, S.H., He, J., Appel, L.J., Whelton, PK., Suh, I., Klag, MJ. 2001. Coffee consumption and serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Am J Epidemiol*,153: 353– 62.

Jeong, D.U. and Dimsdale, J.E. 1990. The effects of caffeine on blood pressure in the work environment. American Journal of Hypertension. 3(10): 749-53.

Kark, J.D., Friedlander, Y., Kaufmann, N.A., Stein, Y. 1985. Coffee, tea, and plasma cholesterol: the Jerusalem Lipid Research Clinic prevalence study. *British Medical Journal (Clinical Research Edition)*, 291(6497): 699-704.

Karmon, A.E., Toth, T., Chiu, Y.H., Gaskins, A., Tanrikut, C. and Wright, D. 2017. Male caffeine and alcohol intake in relation to semen parameters and in vitro fertilization outcomes among fertility patients. *Androl*, 5(2): 354-61.

Keijzers, G.B., De Galan, BE., Tack, C.J., Smits, P. 2002. Caffeine can decrease insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care*, 25: 364 –9.

Kim, B., Nam, Y., Kim, J., Choi, H., Won, C. 2012. Coffee consumption and stroke risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Korean J Fam Med*, 33(6): 356–65.

Klotz, L.O., Kröncke, K.D., Buchczyk, D.P., Sies, H. 2003. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Nutr*, 133(5):1448S-51S

Koblihová, E., Mrázová, I., Vernerová, Z. and Ryska, M. 2014. Acute liver failure induced by thioacetamide: selection of optimal dosage in Wistar and Lewis rats. *Physiol Res*. 2014;63(4):491-503.

Kono, Y. and Fridovich, I. 1982. Superoxide Radical Inhibits Catalase. Volume 257, 5751–5754p.

Kuramochi, M., Izawa, T., Pervin, M., Bondoc, A., Kuwamura, M. and Yamate, J. 2016. The kinetics of damage-associated molecular patterns (DAMPs) and toll-like receptors during thioacetamide-induced acute liver injury in rats. Exp Toxicol Pathol. 68(8):471-7.

Kuramochi, M., Izawa, T., Pervin, M., Bondoc, A., Kuwamura, M. and Yamate, J. 2016. The kinetics of damage-associated molecular patterns (DAMPs) and toll-like receptors during thioacetamide-induced acute liver injury in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 68(8): 471-477.

L´ opez, J. P. 2001. Fisiolog´ıa del endotelio vascular, in Bioqu´ımica del Endotelio Vascular: Implicaciones Fisiol´ogicas y Cl´ınicas, P. Lo´pez-Jaramillo, Ed., Horizonte Impresores, Bogot´a, Colombia, 5th edition, 41–58.

Leijten P. A. A. and van Breemen, C. 1984. The effects of caffeine on the noradrenaline-sensitive calcium store in rabbit aorta, *Journal of Physiology*, 357, 327–339.

Leite, M.R., Wilhelm, E.A., Jesse, C.R., Brandão, R. and Nogueira, C.W. 2011. Protective effect of caffeine and a selective A2A receptor antagonist on impairment of memory and oxidative stress of aged rats. *Exp Gerontol*, 46(4): 309-15.

Liddell, C.M. Summers, C.J. 2004. Nonspherical ZnS colloidal building blocks for three-dimensional photonic crystals, *J. Colloid. Interfaces. Sci*, 274: 103-106.

Lindahl, B., Johansson, I., Huhtasaari, F., Hallmans, G. and Asplund, K. 1991. Coffee drinking and blood cholesterol--effects of brewing method, food intake and life style. *Journal of Internal Medicine*, 230(4): 299 305.

Lochen, M.L., Rasmussen, K. 1996. Palpitations and lifestyle: impact of depression and self-rated health. The Nordland Health Study. *Scandinavian journal of social medicine*, 24(2): 140-4.

Lovallo, W.R., Al'Absi, M., Blick, K., Whitsett, T.L. and Wilson, M.F. 1996. Stress-like adrenocorticotropin responses to caffeine in young healthy men. Pharmacology, *Biochemistry and Behavior*, 55(3): 365-9.

Lynn, LA., Kissinger, J.F. 1992. Coronary precautions: Should caffeine be restricted in patients with myocardial infarction?, *Heart Lung*,21(4): 365-71.

Manach, C., Mazur, A., Scalbert, A. 2005. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol*, 16: 77–84.

Martin, C., Dacquet, C., Mironneau, C. and Mirroneau, J. 1989. Caffeine-induced inhibition of calcium channel current in cultured smooth muscle cells from pregnant rat myometrium, *British Journal of Pharmacology*, 98(2): 493–498.

Massey, L.K. 1998. Caffeine and the elderly. *Drugs Aging*, 13(1): 43-50.

Matés, J.M. 2000. Effects of Antioxidant Enzymes in the Molecular Control of Reactive Oxygen Species Toxicology. Volume 153, 83–104p.

Mcclements, D.J. 2015. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *journal Soft Matter*, 6: 1-11.

McGee, M.B. 1980. Caffeine poisoning in a 19-year-old female. *J Forensic Sci*, 5(1): 29–32.

McShea, A., Ramiro-Puig, E., Munro, SB., Casadesus, G., Castell, M., Smith, MA. 2008. Clinical benefit and preservation of flavonols in dark chocolate manufacturing. *Nutr Rev*, 66: 630–41.

Missiaen, L., Parys, J. B., De Smedt, H. 1994. Himpens, B. and Casteels, R. Inhibition of inositol trisphosphate-induced calcium release by caffeine is prevented by ATP, *Biochemical Journal*, 300(1): 81–84.

Momoi, N., Tinney, J.P., Liu, L.J., Elshershari, H., Hoffmann, P.J., Ralphe, J.C. *et al*. 2008. Modest maternal caffeine exposure affects developing embryonic cardiovascular function and growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294(5): H2248–56.

Mostofsky, E., Rice, MS., Levitan, EB., Mittleman, MA. 2012. Habitual coffee consumption and risk of heart failure: a dose-response meta-analysis. *Circ Heart Fail*, 5(4): 401–5.

Nava-Alvarez, R., Razo-Estrada, A.C. and Garcia-Medina, S. 2014. Metals and nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals drugs present in water from Madín Reservoir (Mexico) induce oxidative stress in gill, blood, and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Contamination and Toxicology*, 67: 281-295.

Niyogi, S., Biswas, S. and Datta, A.G. 2001. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. *Mari Environ*, 52(1): 13-26.

Noordzij, M., Uiterwaal, C.S., Arends, L.R., Kok, F.J, Grobbee, D.E., Geleijnse, JM. 2005. Blood pressure response to chronic intake of coffee and caffeine: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens*, 23: 921– 8.

Nurminen, M.L., Niittynen, L., Korpela, R. and Vapaatalo, H. 1999. Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(11): 831-9.

Oei, S.G., Vosters, R.P., van der Hagen, N.L. 1989. Fetal arrhythmia caused by excessive intake of caffeine by pregnant women. *BMJ*, 298(6673): 568.

Ozaki, H., T. Ohyama, K. Sato, and Karaki, H. 1990. Ca2+- dependent and independent mechanisms of sustained contraction in vascular smooth muscle of rat aorta. *Japanese Journal of Pharmacology*, 52(3): 509–512.

Paiva, C., Beserra, B., Reis, C., Dorea, J.G., Da Costa, T., Amato, A.A. 2019. Consumption of coffee or caffeine and serum concentration of inflammatory markers: A systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 59(4): 652-63.

Panagiotakos, D.B., Pitsavos, C., Chrysohoou, C., Kokkinos, P., Toutouzas, P. and Stefanadis, C. 2003. The Jshaped effect of coffee consumption on the risk of developing acute coronary syndromes: the CARDIO2000 casecontrol study. *Journal of Nutrition*, 133(10): 3228-32.

Park, M., Choi, Y., Choi, H., Yim, J.Y. and Roh, J. 2015. High doses of caffeine during the peripubertal period in the rat impair the growth and function of the testis. *Int J Endocrinol*, 11 (5): 951-961.

Partosch, F., Mielke, H., Stahlmann, R. and Gundert-Remy, U. 2015. Caffeine intake in pregnancy: Relationship between internal intake and effect on birth weight. *Food and chem toxicol*, 86: 291-7.

Patra, R.C., Swarup, D. and Senapati, S.K. 1999. Effects of cadmium on lipid peroxides and superoxide dismutase in hepatic, renal and testicular tissue of rats. Veterinary and Human Toxicology, 41(2): 65–67.

Praskova, E., Plhalova, L., Chromcova, L., Stepanova, S., Bedanova, I., Hostovsky, M., Skoric, M., Marsalek, P. and Voslarova Svobodova, Z. 2014. Effects of Subchronic Exposure of Diclofenac on Growth, Histopathological Changes and Oxidative Stress in Zebra fish (*Danio rerio*). *The Scientific World Journal*, 4: 545-549.

Qi, H. and Li, S. 2014. Dose–response meta- analysis on coffee, tea and caffeine consumption with risk of P arkinson's disease. *Geriatr Gerontol Int*, 14(2): 430-9.

Ramlau-Hansen, C., Thulstrup, A.M., Bonde, J.P., Olsen, J. and Bech, B. 2008. Semen quality according to prenatal coffee and present caffeine exposure: two decades of follow-up of a pregnancy cohort. *Hum Rep*, 23(12): 2799-805.

Rauh, R., Burkert, M., Siepmann, M. and Mueck- Weymann, M. 2006. Acute effects of caffeine on heart rate variability in habitual caffeine consumers. *Clin physiol funct I*, 26(3): 163-6.

Risner, C.H. 2008. Simultaneous determination of theobromine, (+)-catechin, caffeine, and (-)- epicatechin in standard reference material baking chocolate 2384, cocoa, cocoa beans, and cocoa butter. *J Chromatogr Sci*, 46: 892–9.

Rivkees, S.A. and Wendler, C.C. 2011. Adverse and protective influences of adenosine on the newborn and embryo: implications for preterm white matter injury and embryo protection. *Pediatr Res*, 2011; 69(4): 271-8.

Robertson, D., Wade, D., Workman, R., Woosley, R.L., Oates, J.A. 1981. Tolerance to the humoral and hemodynamic effects of caffeine in man. *J Clin Invest*, 67: 1111–7.

Roca, D.J., G.D. Schiller, and D.H. 1988. Farb Chronic Caffeine or Theophylline Exposure Reduces Gammaaminobutyric Acid/Benzodiazepine Receptor Site Interactions. *Molecular Pharmacology*, 33(5): 481-85.

Rosenberg, L., Palmer, J. R., Kelly, J. P., Kaufman, D. W. and Shapiro, S. 1988. Coffee drinking and nonfatal myocardial infarction in men under 55 years of age, *American Journal of Epidemiology*, 128 (3): 570–578.

Rosengren, A., Hawken, S., Ounpuu, S., Sliwa, K., Zubaid. M., Almahmeed, W.A., Blackett, K.N., Sitthi-amorn, C., Sato, H. and Yusuf, S. 2004. INTERHEART investigators.. Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11119 cases and 13648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 364(9438): 953-62.

Rosmarin, P.C. 1989. Coffee and coronary heart disease: a review. Progress in ardiovascular Diseases, 32(3): 239-45.

Saleh, D.O., Abdel Jaleel, G.A., El-Awdan, S.A., Oraby, F., Badawi, M. 2014. Thioacetamide-induced liver injury: protective role of genistein. *Can J Physiol Pharmacol*. 92(11): 965-73.

Saleh, DO., Abdel Jaleel, G.A, El-Awdan, SA., Oraby, F.and Badawi, M. 2014. Thioacetamide-induced liver injury: protective role of genistein. Can J Physiol Pharmacol. 2014;92(11):965-73.

Salvaggio, A., Periti, M., Miano, L., Quaglia, G. and Marzorati, D. 1991. Coffee and cholesterol, an Italian study. American Journal of Epidemiology, 134(2): 149-56.

Sarobo, C., Lacorte, L.M., Martins, M., Rinaldi, J.C, Moroz, A., Scarano, W.R. 2012. Chronic caffeine intake increases androgenic stimuli, epithelial cell proliferation and hyperplasia in rat ventral prostate. *Int J Exp Pathol*, 93(6): 429-37.

Sato, K., Ozaki, H. and Karaki, H. 1988. Changes in cytosolic calcium level in vascular smooth muscle strip measured simultaneously with contraction using fluorescent calcium indicator fura 2, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 246 (1): 294–300.

Satyabhama, S. Padmanaban, G. 1984. Effect of thioacetamide on cytochrome P-450 synthesis in rat liver. *Biochem. J*, 218, 371-377.

Saucedo-Vence. K., Dublán-García O, López-Martínez, L.X., Morachis-Valdes, G., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H. and Gómez,Oliván, L.M. 2015. Short and long-term exposure to diclofenac alter oxidative stress status in common carp Cyprinus carpio. *Ecotoxicology*, 24(3): 527-39.

Serapiao-Moraes, D.F., Souza-Mello, V., Aguila, M.B., Mandarim-de- Lacerda C.A., Faria, T.S. 2013. Maternal caffeine administration leads to adverse effects on adult mice offspring. *Eur J Nutr*, 52(8): 1891–900.

Sharma, V.K. Rendon, R.A. Millero, F.J. Vazquez, F.G. 2000. Oxidation of thioacetamide by ferrate (VI). *Mar. Chem*, 70: 235-242.

Shin, W. S., Kawaguchi, H., Sasaki, T. 1996. *et al*., The role of nitric oxide in the cardiovascular system, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 786. 233–244.

Shirlow, M.J. and Mathers, C.D. 1985. A study of caffeine consumption and symptoms; indigestion, palpitations, tremor, headache and insomnia. *International Journal of Epidemiology*, 14(2): 239-48.

Shirlow, M.J., Berry, G. and Stokes, G. 1988. Caffeine consumption and blood pressure: an epidemiological study. International Journal of Epidemiology, 17(1): 90-7.

Silva, H.D., Cerqueira, M.Â. and Vicente, A.A. 2012. Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. *Springer New York LLC / Food and Bioprocess Technology*, 5(3): 854–867.

Sirag, H.M. 2006. Protective Effects of Omega Supplement on Induced Hepatic Mal-Function by Thioacetamide in Male Rats. *Mansoura J. Forensic Med. Toxicol*, 15: 99-115.

Sofi, F., Conti, A. A., Gori, A. M. *et al*., 2007. Coffee consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis, Nutrition, *Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 17(3): 209–223.

Spiller, M.A. 1998. The chemical components of coffee. In: Spiller GA, editor. Caffeine. Boca Raton: CRC Press. p. 97–161.

Sudano, I., Spieker, L. E., Hermann, F. 2006. Protection of endothelial function: targets for nutritional and pharmacological interventions, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 47 (2): S136–S150.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J. and Solans, C. 2004. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109: 303–318.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J. and Solans, C. 2004–a. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109: 303–318.

Troncoso, E., Aguilera, J.M. and McClements, D.J. 2012. Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 27(2): 355–363.

Umemura, T., Ueda, K., Nishioka, K. 2006. Effects of acute administration of caffeine on vascular function, *American Journal of Cardiology*, 98(11): 1538–1541.

Urgert, R., van Vliet, T., Zock, P.L., Katan, M.B. 2000. Heavy coffee consumption and plasmahomocysteine: a randomized controlled trial in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr*, 72: 1107–10.

van Dusseldorp, M., Katan, M.B. and Demacker, P.N. 1990. Effect of decaffeinated versus regular coffee on serum lipoproteins. A 12-week double-blind trial. *American Journal of Epidemiology*, 132(1): 33-40.

Verhoef, P., Pasman, W.J., Van Vliet, T., Urgert, R. and Katan, M.B. 2002. Contribution of caffeine to the homocysteine-raising effect of coffee: a randomized controlled trial in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76(6): 1244-8.

Vik, T., Bakketeig, L.S., Trygg, K.U., Lund- Larsen, K. and Jacobsen, G. 2003. High caffeine consumption in the third trimester of pregnancy: gender- specific effects on fetal growth. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 17(4): 324-31.

Voerman, E., Jaddoe, V.W., Hulst, M.E., Oei, E.H., Gaillard, R. 2019. Associations of maternal caffeine intake during pregnancy with abdominal and liver fat deposition in childhood. *Pediatr Obes* 27: 12607-12612.

Waring, W.S., Goudsmit, J., Marwick, J., Webb, D.J. and Maxwell, S.R.J. 2000. Acute caffeine intake influences central more than peripheral blood pressure in young adults. *American Journal of Hypertension*. 16(11): 919-24.

Watanabe, C., Yamamoto, H., Hirano, K., Kobayashi S. and Kanaide, H. 1992. Mechanisms of caffeine-induced contraction and relaxation of rat aortic smooth muscle, *Journal of Physiology*, 456: 193–213.

Wilson, K.M., Kasperzyk, J.L., Rider, J.R., Kenfield, S., van Dam, R.M. and Stampfer, M.J. 2011. Coffee consumption and prostate cancer risk and progression in the Health Professionals Follow-up Study. *J Natl Cancer Inst*, 103(11): 876-84

Y**ilmaz, H.R., Turkoz, Y., Yuksel, E. and Orun, I**. 2006.An Investigation of Antioxidant Enzymes Activities in Liver of *Cyprinus carpio* Taken from Different Stations in the Karakaya Dam Lake. *International Journal of Science and Technology*, 1: 1-6

Yukawa, GS., Mune, M., Otani, H., Tone, Y., Liang, X-M., Iwahashi, H. *et al*. 2004. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of Low-Density Lipoproteins and serum lipid levels in humans. *Biochem*, 69(1): 70-4.

Zappettini, S., Faivre, E., Ghestem, A., Carrier, S., Buee, L., Blum, D. 2019. Caffeine Consumption During Pregnancy Accelerates the Development of Cognitive Deficits in Offspring in a Model of Tauopathy. *Front Cell Neurosci*, 13: 438-146.

Abstract

University of Zabol
Faculty of veterinary medicine
Department of clinical sciences

The Thesis Submitted for the Degree of PhD in professional (In the Field of veterinary medicine)

The effect of caffeine nanomulation thiostamide induced histological changes on testicular tissue of rabbit

Supervisor
Dr. …

Advisors
Dr. …

By
Mostafa Mohammadi

September 2021