



دانشگاه پیام نور استان تهران

مرکز تهران شرق

دانشکده علوم پایه

عنوان پایان نامه :

بررسی اثرات ضد سرطانی نانوذرات اکسید روی و نانوکامپوزیت اکسید شده روی و نقره روی

سلولهای رده سرطانی ملانوما (A-375) و رده سرطانی معده (AGS)

پایان نامه یا رساله برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته زیست شناسی گرایش بیوشیمی

نام دانشجو:

مینا مهدوی راد

استاد راهنما:

دکتر نوروز نجف زاده

اساتید مشاور:

دکتر حبیب اله ناظم

۱۳۹۳

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

صورتجلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

نام مرکز: دانشگاه پیام نور مرکز تهران شرق

شماره دانشجویی: ۹۱۷۷۲۴۰۹۸

نام دانشجو: مینا مهدوی راد

گرایش: بیوشیمی

رشته: زیست شناسی

عنوان پایان نامه / رساله: بررسی اثرات ضد سرطانی نانوذرات اکسید روی و نانو کامپوزیت اکسید

شده روی و نقره روی سلولهای رده سرطانی ملانوما (A-375) و رده سرطانی معده (AGS)

تاریخ دفاع: ۱۳۹ / /

نمره و درجه پایان نامه / رساله:

ردیف	سمت	نام و نام خانوادگی	مرتبه دانشگاهی	دانشگاه یا مؤسسه	امضا
۱	استاد راهنما	نوروزنجف زاده	استادیار	دانشکده علوم پزشکی	
۲	استاد راهنمای همکار				
۳	استاد مشاور ۱	حبیب اله ناظم	دانشیار	دانشگاه پیام نور	
۴	استاد مشاور ۲				
۵	استاد داور				
۶	نماینده گروه آموزشی و پژوهشی استان				

گواهی اصالت، نشر و حقوق مادی و معنوی اثر

اینجانب مینا مهدوی راد دانشجوی ورودی سال ۱۳۹۱ مقطع کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی (بیوشیمی) گواهی می‌نمایم چنانچه در پایان نامه خود از فکر، ایده و نوشته

دیگری بهره گرفته‌ام با نقل قول مستقیم یا غیرمستقیم منبع و ماخذ آن را نیز در جای مناسب ذکر کرده‌ام. بدیهی است مسئولیت تمامی

مطالبی که نقل قول دیگران نباشد بر عهده خویش میدانم و جوابگویی آن خواهم بود.

دانشجو تأیید مینماید که مطالب مندرج در این پایان نامه یا رساله نتیجه تحقیقات خودش می‌باشد و در صورت استفاده از نتایج دیگران مرجع آن را ذکر نموده است.

نام و نام خانوادگی دانشجو: مینا مهدوی راد

تاریخ و امضاء:

اینجانب مینا مهدوی راد دانشجوی ورودی سال ۱۳۹۱ مقطع کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی (بیوشیمی) گواهی مینمایم چنانچه براساس مطالب پایان نامه خود اقدام به انتشار مقاله، کتاب، و نمایم ضمن مطلع

نمودن استاد راهنما، با نظر ایشان نسبت به نشر مقاله،

کتاب، و ... و به صورت مشترک و با ذکر نام استاد راهنما مبادرت نمایم.

نام و نام خانوادگی دانشجو: مینا مهدوی راد

تاریخ و امضاء:

(کلیه حقوق مادی مترتب از نتایج مطالعات، آزمایشات و نوآوری ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه پیام نور می

باشد.)

تقدیم به

پروردگار مهربانم که مرا به طریق علم و دانش رهنمونم کرد.

و

به خانواده عزیزم که با صبر و شکیبایی پناه خستگیم بودند.

تشکر و قدردانی:

شکر و سپاس خدا را که بزرگترین امید و یاور در لحظه لحظه زندگیست. نمی توانم معنایی بالاتر از تقدیر و تشکر بر زبانم جاری سازم و سپاس خود را در وصف استادان خویش آشکار نمایم، که هر چه گویم و سرایم ، کم گفته ام.

و سپاس بی نهایت از استاد محترم جناب آقای دکتر نوروز نجف زاده که بدون صبر و پشتیبانی و راهنمایی های ایشان پیشبرد این پایان نامه مقدور نبود.

و از استاد محترم جناب آقای دکتر حبیب اله ناظم تقدیر و تشکر می نمایم.

کلیه مراحل این تحقیق در آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول های بنیادی گروه علوم تشریحی و پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام گردیده ، لذا بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر از دانشگاه علوم پزشکی اردبیل به عمل می آید.

چکیده :

مقدمه و هدف: ملانوما تومور بدخیمی است که از ملانوسیت های پوست منشأ می گیرد و این بیماری در مراحل اولیه جراحی قابل درمان است ولی با پیشرفت بیماری غیرقابل درمان می شود و شیوع آن نسبت به دیگر سرطان ها بسیار افزایش داشته است. همچنین سرطان معده و مری دستگاه گوارش از جمله سرطان های شایع در جهان می باشد به طوری که سرطان معده چهارمین سرطان شایع و دومین علت منجر به مرگ ناشی از سرطان ها می باشد. در این مطالعه، اثر ضد سرطانی نانوکامپوزیت اکسید روی و نقره روی سلول های انسانی سرطان ملانوما رده (A-375) و سرطان معده رده (AGS) مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: در این مطالعه تجربی سلول های انسانی سرطان ملانوما (A-375) و سرطان معده (AGS) در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰% سرم گاوی و پنی سیلین / استرپتومایسین (۱۰۰ واحد/۱۰۰ میکروگرم) کشت داده شد و پس از تاثیر رقت های مختلف نانوکامپوزیت اکسید روی و نقره بر روی این سلول ها IC50 با روش MTT ، کلونی با روش ارزیابی کلونی، مرگ سلولی با رنگ آمیزی آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید و توقف چرخه سلولی با فلوسایتومتری بررسی شد.

نتایج: یافته ها نشان داد تاثیر نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی / نقره ، روی مرگ سلولهای سرطانی ملانوما و سلول های سرطان معده تقریباً مشابه اکسید روی است. رقت ها در محدوده ۳۰ تا ۹۸/۴۶ میکروگرم اکسید روی و ترکیب اکسید روی با نقره اثرات ضد سرطانی قابل ملاحظه ای داشت. هرچند رقتهای کمتر از ۳۰ میکروگرم اثرات ضد سرطانی کمتری داشت و IC50 (غلظتی از ترکیب مورد بررسی که ۵۰ درصد از حیات سلولی را به نصف کاهش می دهد) اثر دارو بر روی سلولهای رده A-375 به ترتیب برای نانوذرات اکسید روی و نانوکامپوزیت اکسید روی ترکیب شده با نقره ، $7/24 \pm 1/54$ و $15/93 \pm 1/73$ میکروگرم در میلی لیتر بود. و IC50 اثر دارو بر روی سلولهای رده AGS به ترتیب برای نانوذرات اکسید روی و نانوکامپوزیت اکسید روی ترکیب شده با نقره ، $9/38 \pm 0/22$ و $34/35 \pm 0/7$ میکروگرم در میلی لیتر بود. بررسی مکانیزم مهار سلولی توسط فلوسایتومتری نشان گر این نکته بود که نانوذرات ZnO و نانوکامپوزیت Ag/ZnO سبب توقف سیکل سلولی در فاز S و G₁ می شوند.

نتیجه نهایی: بنابراین، نانوکامپوزیت اکسید روی و ترکیب آن با نقره توانایی القا مرگ سلولی روی سلولهای سرطان ملانوما و سرطان معده در غلظت های در حد میکرومولار دارد و این یافته ها دیدگاه جدیدی را در زمینه استفاده از نانوکامپوزیت در درمان سرطان فراهم می آورد.

کلید واژه ها : سرطان ، ترکیب نانویی اکسید روی با نقره ، روش فلوسایتومتری ، رده سلولی ملانوما (A-375) ، رده سلولی معده (AGS)

فهرست مطالب

عنوان

صفحه

فصل اول: طرح تحقیق

- ۱-۱- مقدمه ۲
- ۱-۲- تعریف واژه های کلیدی ۵
- ۱-۳- اهداف ۵
- ۱-۴- فرضیات ۶

فصل دوم: مروری بر منابع

۲-۱- مقدمه

- ۲-۱-۱- تاریخچه فناوری نانو ۸
- ۲-۱-۲- نانوتکنولوژی و نانومواد ۹
- ۲-۱-۳- نانوبیوتکنولوژی و نانوذرات ۱۰
- ۲-۱-۴- نانوپزشکی و کاربردهای پزشکی نانوذرات ۱۱
- ۲-۱-۵- نانوذرات و سمیت آنها ۱۳
- ۲-۱-۶- سرطان ۱۴
- ۲-۱-۶-۱- بیولوژی سرطان ۱۵

- ۲-۱-۶-۲ پروتوانکوژن..... ۱۷
- ۲-۱-۶-۳ چرخه سلولی..... ۱۷
- ۲-۱-۶-۴ مرگ سلول: آپوپتوز و نکروز..... ۱۸
- ۲-۱-۶-۵ میزان شیوع سرطان..... ۲۱
- ۲-۱-۶-۶ سرطان معده..... ۲۲
- ۲-۱-۶-۷ سرطان ملانوما..... ۲۲
- ۲-۱-۷ بررسی اجمالی از فناوری نانو در سرطان..... ۲۳
- ۲-۱-۸ اهمیت خواص فیزیکی و کاربردهای بیولوژیکی نانومواد در درمان سرطان..... ۲۴
- ۲-۱-۹ نانوذرات اکسید روی..... ۲۴
- ۲-۱-۹-۱ کاربردهای نانوذرات اکسید روی..... ۲۵
- ۲-۱-۹-۱-۱ کاربردهای پزشکی نانوذرات اکسید روی..... ۲۵
- ۲-۱-۹-۲ مکانیسم ضدباکتریایی اکسید روی..... ۲۷
- ۲-۱-۹-۳ مکانیسم ضدسرطانی نانوذرات اکسید روی..... ۲۸
- ۲-۱-۹-۳-۱ مکانیسم گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)..... ۲۹
- ۲-۱-۱۰ نانوذرات نقره..... ۳۱
- ۲-۱-۱۰-۱ سنتز نانوذرات نقره..... ۳۲
- ۲-۱-۱۰-۲ بیوشیمی سنتز نانوذرات نقره..... ۳۳
- ۲-۱-۱۰-۳ کاربرد نانوذرات نقره..... ۳۴
- ۲-۱-۱۰-۴ مکانیسم ضدسرطانی نانوذرات نقره..... ۳۶
- ۲-۱-۱۱ نانوکامپوزیت اکسید شده روی و نقره..... ۳۶
- ۲-۱-۱۲ نتیجه گیری..... ۳۷

فصل سوم: روش تحقیق

- ۳-۱ نوع پژوهش..... ۳۹
- ۳-۱-۱ جمعیت مورد مطالعه..... ۳۹

۳۹ ۳-۱-۲- داروها
۳۹ ۳-۱-۲-۱- روش تهیه نانوذرات اکسیدروی طی روش تجزیه اگزالات
۴۱ ۳-۱-۲-۲- روش تهیه نانوکامپوزیت اکسیدشده روی و نقره طی روش تجزیه اگزالات
۴۴ ۳-۱-۳- تهیه استوک اولیه
۴۴ ۳-۱-۳-۱- استوک اولیه نانوذرات اکسید روی
۴۴ ۳-۱-۳-۲- استوک اولیه نانوکامپوزیت اکسیدشده روی و نقره
۴۴ ۳-۱-۴- مواد مصرفی
۴۵ ۳-۱-۴-۱- پروتکل تهیه محلول DAPI
۴۶ ۳-۱-۴-۲- پروتکل تهیه محلول PBS ، ۱۰X
۴۶ ۳-۱-۴-۳- روش تهیه یک لیتر محیط کشت RPMI-1640
۴۷ ۳-۱-۴-۴- روش تهیه رنگ MTT
۴۷ ۳-۱-۴-۵- روش تهیه ۱۰ سی سی آکریدین اورنج - اتیدیوم برماید
۴۷ ۳-۱-۴-۶- روش تهیه رنگ کریستال ویوله
۴۷ ۳-۱-۵- وسایل مورد استفاده
۴۹ ۳-۱-۶- دستگاه های لازم
۴۹ ۳-۲- روش
۴۹ ۳-۲-۱- کشت سلولی
۵۰ ۳-۲-۱-۱- گروه های مورد سنجش
۵۰ ۳-۲-۲- بازیافت فریز و کشت آن
۵۰ ۳-۲-۳- فریز کردن
۵۰ ۳-۲-۴- تحت کشت
۵۱ ۳-۲-۵- اندازه گیری بقاء سلولی (Viability)
۵۱ ۳-۲-۶- اندازه گیری تعیین فعالیت متابولیکی
۵۱ ۳-۲-۷- شمارش سلولی با هماسیتومتر (نئوبا ر)
۵۲ ۳-۲-۸- روش کار تعیین فعالیت متابولیکی و تکثیر سلولی (MTT)

- ۵۲.....IC₅₀ محاسبه ۳-۲-۹
- ۵۳.....بررسی مورفولوژی سلولی با رنگ آمیزی اکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید. ۳-۲-۱۰
- ۵۳.....روش رنگ آمیزی اکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید برای آپتوز. ۳-۲-۱۱
- ۵۳.....بررسی چرخه سلولی با فلوسایتومتری. ۳-۲-۱۲
- ۵۴.....روش کار فلوسایتومتری. ۳-۲-۱۳
- ۵۴.....روش کلونی کانت. ۳-۲-۱۴
- ۵۵.....روش تجزیه تحلیل داده. ۳-۲-۱۵

فصل چهارم: نتایج و تفسیر آنها

- ۵۷.....بررسی مقدار IC₅₀ و میزان بقاء سلول. ۴-۱
- ۶۲.....بررسی مرگ سلولی. ۴-۲
- ۶۶.....بررسی چرخه سلولی با دستگاه فلوسایتو متری. ۴-۳
- ۷۱.....بحث. ۴-۴

فصل پنجم: جمع بندی و پیشنهاد ها

- ۸۴.....جمع بندی. ۵-۱
- ۸۵.....نوآوری. ۵-۲
- ۸۵.....پیشنهادهایی برای ادامه کار. ۵-۳
- ۸۵.....جنبه کاربردی موضوع پایانامه. ۵-۴
- ۸۵.....محدودیت ها. ۵-۵
- ۸۶.....منابع و مأخذ.
- ۹۹.....چکیده انگلیسی.

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۲- تصویر از ویژگی های مورفولوژیکی نکرز و آپیتوز.....	۲۰
شکل ۱-۳- تصویر شماتیک از مراحل سنتز نانوذرات اکسیدروی از تجزیه اگزالات.....	۴۰
شکل ۲-۳- تصویر شماتیک از مراحل سنتز نانوکامپوزیت اکسیدروی و نقره از تجزیه اگزالات.....	۴۲
شکل ۳-۳- اشکال TEM از (a) نانوکامپوزیت اکسیدشده روی و نقره (b) نانوذرات اکسیدروی.....	۴۳
شکل ۴-۳- اشکال EM از (a) نانوکامپوزیت اکسیدشده روی و نقره (b) نانوذرات اکسیدروی.....	۴۳
شکل ۱-۴- رنگ آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید رده ی سلولی AGS تیمار شده با نانوذرات zno و نانوکامپوزیت L Ag zno: سلول های زنده ، Ap: سلول های آپویتیک ، N: سلول های نکروتیک.....	۶۴
شکل ۲-۴- رنگ آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید رده ی سلولی A375 تیمار شده با نانوذرات zno و نانوکامپوزیت L Ag zno: سلول های زنده ، Ap: سلول های آپویتیک ، N: سلول های نکروتیک.....	۶۵
شکل ۳-۴- اشکال سلول های رنگ آمیزی شده به روش DAPI از (a) سلول های A375 (b) سلول های AGS.....	۶۶

فهرست جداول و نمودارها

عنوان

صفحه

- جدول ۴-۱ مقدار IC50 بدست آمده از اثر نانوذرات zno و نانوکامپوزیت Ag zno بر روی رده های سلولی AGS و A375 توسط MTT (۲۴ و ۴۸ ساعته) و کلونی کانت. مقادیر بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر می باشد ۶۱
- جدول ۴-۲ درصد سلول های زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک رده های سلولی AGS و A375 که با نانوذرات zno و نانوکامپوزیت Ag zno تیمار شده اند..... ۶۳
- جدول ۴-۳ درصد سلول ها در فازهای G1، S و G2M مربوط به رده های سلولی AGS و A375 که با غلظت بین IC50 و نصف IC50 نانوذرات zno و نانوکامپوزیت Agzno تیمار شده اند ۶۸
- جدول ۴-۴ : درصد سلول ها در فازهای G1، S و G2M مربوط به رده های سلولی AGS و A375 که با غلظت نصف IC50 نانوذرات zno و نانوکامپوزیت Agzno تیمار شده اند ۷۰
- نمودار ۴-۱- میزان بقای سلولی بدست آمده از اثر نانوذرات Zno و نانوکامپوزیت Ag/zno بر روی رده سلولی A375 توسط MTT Assay (۲۴ و ۴۸ ساعته) مقادیر بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر می باشد..... ۵۹
- نمودار ۴-۲- میزان بقای سلولی بدست آمده از اثر نانوذرات Zno و نانوکامپوزیت Ag/zno بر روی رده سلولی AGS توسط MTT Assay (۲۴ و ۴۸ ساعته) مقادیر بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر می باشد..... ۶۰
- نمودار ۴-۳- توزیع جمعیتی سلول های تیمار شده با غلظت $IC_{50}^{3/4}$ نانوذرات zno و نانوکامپوزیت Ag/zno در مراحل مختلف چرخه سلولی با استفاده از فلوسایتومتری، a و b و c) رده سلولی A375، d و e و f) رده سلولی AGS..... ۶۷
- نمودار ۴-۴- توزیع جمعیتی سلول های تیمار شده با غلظت $IC_{50}^{1/2}$ نانوذرات zno و نانوکامپوزیت Ag/zno در مراحل مختلف چرخه سلولی با استفاده از فلوسایتومتری، a و b و c) رده سلولی A375، d و e و f) رده سلولی AGS..... ۶۹

فهرست علائم اختصاری

Ag: Silver

AL₂O₃: Aluminium Oxide

ATP: Adenosine Triphosphate

CDK: Cyclin Dependent Kinase

Cds: Cadmium Sulfide

Cdse: : Cadmium Selenide

CeO₂: Cerium dioxide

CUO₂: Copper dioxide

DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DNA: Deoxyribonucleic Acid

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid

FBS: Fetal Bovine Serum

Fe²⁺: Ionic Iron

Fe₂O₃: Iron oxid

FDA: Food and Drug Administration

GRAS: Generally Recognized As Safe

H₂O₂ : Hydrogen Peroxide

IC₅₀: 50% Inhibitory Concentration

IFN_γ : Interferon Gamma

IL-12: Interleukin-12

MTT: 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenylterazolium bromide

NAC : N-Acetyl Cysteine

NNI : Federal organization National Nanotechnology Initiative

NK: Natural killer cell

NO: Nitric Oxide

NP: Nanoparticle

O₂: Molecular Oxygen

O₂⁻: Superoxide Anion

·O₂⁻: Superoxide Radical

OH[·] : Hydroxide Radical

OH: Hydroxide Radical

PBS: Phosphate Buffered Saline

QD: Quantum Dot

ROS: Reactive Oxygen Species

SEM: Scanning Electron Microscope

SiO₂: Silicon Dioxide

SnO₂: Tin Dioxide

SPR: Surface Plasmon Resonance

μg: microgram

TEM: Transmission Electron Microscopy

TiO₂: Titanium Dioxide

ZnO: Zinc Oxide

Znc: Zinc Carbide

فصل ١ :

طرح تحقيق