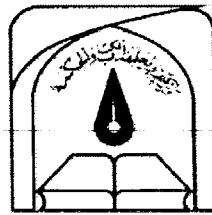


بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِيْمِ  
الْحٰمِدُ لِلّٰهِ الْعَلِيِّ

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِيْمِ  
الْحٰمِدُ لِلّٰهِ الْعَلِيِّ

۳۳۶۹۳



دانشگاه تربیت مدرس  
دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد همایوگی

بررسی اثرات احتمالی میتوژنیک و سیتو توکسیک عنصر روی (Zinc)  
بر روی سلولهای بدخیم (رده لنفوئیدی) Raji و Molt-4

نگارش:

حسن تکمه داشی

۱۳۸۱ / ۰۵ / ۲۰

استاد راهنما:

دکتر فرزانه اوسطی آشتیانی

استاد مشاور:

دکتر علی اکبر پور فتح الله

حسن تکمه داشی

۱۳۸۱ بهار

۳۳۶۹۷۰

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان نامه کارشناسی ارشد آقای حسن تکمه داشی

گرایش:

رشته: هما تولوی

تقدیم می شود. اینچنان نسخه نهائی این پایان نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

سرکار خانم دکتر فرزانه اوسطی آشتیانی (استاد راهنمای)

جناب آقای دکتر علی اکبر پورفتح الله (استاد مشاور)

جناب آقای دکتر حسین مزدارانی (استاد ناظر و نماینده شورای تحصیلات تکمیلی)

جناب آقای دکتر فرهاد ذاکر (استاد ناظر)

محمد رضا  
کاظمی  
دانشجوی

## آیین نامه چاپ نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند.

ماده از : در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)، مراتب را قبلاً بطور کتبی به مرکز نشر دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند.  
کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته خون شناسی است که در سال ۱۳۸۱ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم دکتر اوسطی آشتیانی و مشاوره جناب آقای دکتر علی اکبر پور فتح ا. از آن دفاع شده است.

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های نشریات دانشگاه تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به مرکز نشر دانشگاه اهدا کند دانشگاه می تواند ما زاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

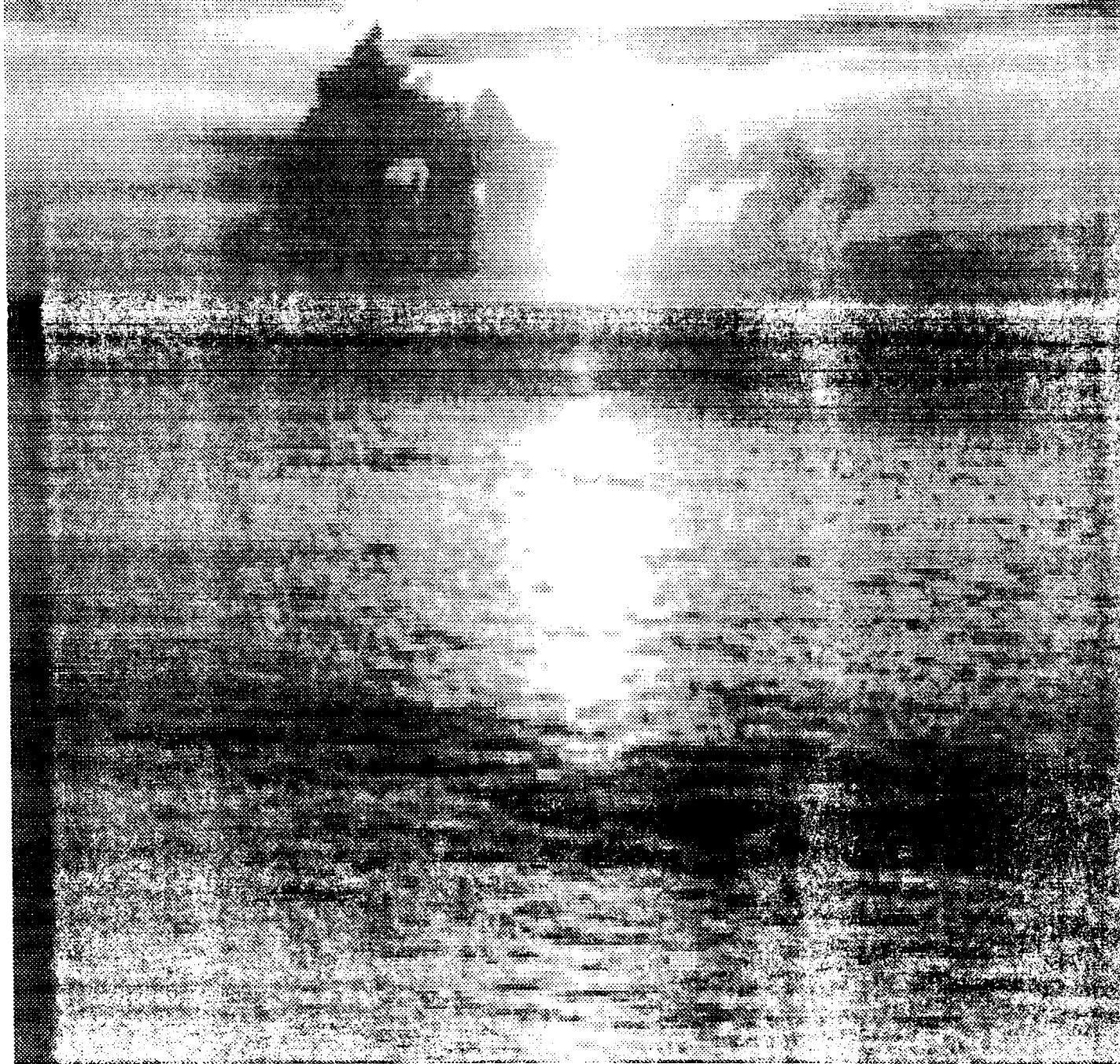
ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را بعنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصل کند، بعلاوه به دانشگاه حق دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقيف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش تأمین نماید.

ماده ۶: اینجانب حسن تکمله داشی دانشجوی رشته هما تولوژی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده ، به آن ملتزم می شوم.

تقدیم به آستان پر مهرت

که ظهورت را در انتظاریم



## تقدیر و تشکر

سپاس خداوندی را که انسان را آفرید و به او قوه اندیشیدن عطا کرد تا در زمینه پدیده های جهان کاوش نماید. وظیفه خود می دانم که از خدمات استاد راهنمای محترم سرکار خانم دکتر آشتیانی و استاتید مشاور جناب آقای دکتر علی اکبر پورفتح الله و آقای مسعود سلیمانی تشکر و قدردانی کنم. بدون شک اگر راهنماییهای این بزرگواران نمی بود انجام این پایان نامه برای حقیر ممکن نمی شد.

از پدر و مادر عزیزم که در طول تحصیل همواره مشوق اینجانب بوده اندکما ل تشکر را دارم و از سایر دوستان و آشنایان که در انجام این پایان نامه مرا یاری نمودند تشکر و قدردانی می نمایم. از گروه هماتولوژی: سرکار خانم دکتر فاطمه نادعلی و خانم اصغری و آقایان کاویانی، اکبری، سعادتیان، اردستانی، کیانی، موشق پور و از سایر گروهها: خانم افشار(کارشناس بخش بیوشیمی)، بخش ایمنی شناسی، قارچ شناسی، بیوتکنولوژی، و ...



## چکیده فارسی

با توجه به نقش مهم عنصر Zinc در ساختار و عملکرد بسیاری از آنزیمهای و پروتئینهای شرکت کننده در اعمال بیولوژیکی بخصوص در حفظ و تعادل سیستم ایمنی و نیز اثرات شناخته شده کمبود Zn در بروز بسیاری از بیماریها، مطالعه موجود به منظور بررسی اثرات احتمالی میتوژنیک و توکسیته عنصر مذکور بر رده های لنقوئیدی B (Raji) و T (Molt-4) در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت. بدین منظور رده های سلولی مذکور در شرایط آزمایشگاهی یکسان در همجاورت غلظت های مختلفی از Zn در زمانهای مختلف (۱۲ تا ۷۲ ساعت) انکوباسیون قرار گرفته و سپس با استفاده از تستهای رنگ آمیزی فلورسانس و بررسی مورفولوژی سلولها با استفاده از رنگ آمیزی رایت - گیمسا، آزمایش تریپان بلووسنچ MTT مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج آنالیز آماری با استفاده از برنامه نرم افزار Spss (آزمون آنالیز واریانس و آزمون دانت) نشان داد که در شرایط آزمایشگاهی هردو رده سلولی مورد مطالعه نسبت به غلظت های متفاوت (۰/۰۱ تا ۰/۰۵  $\mu\text{m}$ ) ، پاسخهای بسیار مشابهی دارند.

در بررسی Viability تکثیر سلولی و تغییرات مورفولوژیکی سلولهای گروه آزمون در غلظت های (۰/۰۱ تا ۰/۰۵  $\mu\text{m}$ ) در تمام ساعت مطالعه (۱۲ تا ۷۲ ساعت) اختلاف معنی داری بین گروه آزمون و گروه شاهد دیده نشد، بطوريکه در هر دو گروه آزمون و شاهد Viability ، بالاي ۹۰٪ بود.اما در ارتباط با تکثیر سلولی تعداد سلولهای گروه آزمون ۴ - Molt در غلظت های (۰/۰۱ و ۰/۰۵  $\mu\text{m}$ ) عنصر Zn ، بمیزان ۵۰٪ نسبت به گروه شاهد ۴ - Molt افزایش نشان داد. در صورتیکه در غلظت های (۰/۰۱ تا ۰/۰۵  $\mu\text{m}$ ) بعد از ۱۶ ساعت انکوباسیون Viability سلولها بین ۷۰ - ۸۵٪ و بعد از ۲۴ ساعت به کمتر از ۵۰٪ کاهش یافت.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که Zn در غلظت های (۰/۰۱ و ۰/۰۵  $\mu\text{m}$ ) و در زمانهای انکوباسیون ۱۲ و ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی ۴ - Molt خاصیت میتوژنیک نشان داد. این شرایط در رده سلولی Raji مشاهده نشد. از طرف دیگر Zn در غلظت های بالای (۰/۰۱  $\mu\text{m}$ ) خاصیت Toxicity داشته و با افزایش غلظت و زمان انکوباسیون بر شدت Toxicity در هردو رده سلولی افزوده شد.

کلمات کلیدی: عنصر روی (Zinc)، Viability، سلول Raji، سلول ۴ - Molt، تکثیر سلولی، مرگ سلولی.

## فهرست مطالع

عنوان		صفحه
<b>فصل اول : مقدمه</b>		۱
۱ - ۱. کلیات عناصر کمیاب (Trace-Elements)		۲
۲-۱. تاریخچه و معرفی خواص فیزیکو شیمیایی روی (Zn)		۳
۲-۱-۱. تداخل Zn و آهن		۳
۲-۱-۲. تداخل Zn و مس		۵
۲-۱-۳. متابولیسم و بیولوژی سلولی Zn		۶
۲-۱-۳-۱. مکانیسم جذب		۶
۲-۱-۳-۲. مکانیسم انتقال		۸
۲-۱-۳-۳. مکانیسم دفع		۹
۲-۱-۳-۴. بیولوژی سلولی Zn		۱۱
<b>فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام شده</b>		۱۲
۱-۱. مروری بر مطالعات انجام شده نقش و اهمیت Zn در سیستمهای بیولوژیک		۱۴
۱-۲. نقشهای متعدد Zn در حفظ سلامتی انسان		۱۵
۱-۲-۱. نقش Zn در متالوآنزیمها		۱۵
۱-۲-۲. نقش Zn در متالوتایونین (MT)		۱۷
۱-۲-۳. نقش Zn در متابولیسم اسیدهای نوکلئیک		۱۷
۱-۲-۴. نقش Zn در پروتئینها و سلولهای موجود در خون		۱۸
۱-۲-۵. سایر نقشهای Zn در حفظ سلامتی انسان		۱۹
۱-۲-۶. مسمومیت باروی (Zn)		۲۰
۱-۲-۷. کمبود Zn - اتیولوژی و مکانیسم آن		۲۰
۱-۴-۱. تشخیص کمبود Zn: از روشهای زیر میتوان در تشخیص کمبود Zn استفاده نمود		۲۲
۱-۴-۲. کاربردهای درمانی ترکیبات حاوی Zn		۲۵
۱-۴-۳. مروری بر مطالعات انجام شده نقش و اهمیت Zn در سیستم ایمنی		۲۷
۱-۴-۴. نقش Zn در پاسخهای ایمنی غیراختصاصی		۲۹
۱-۴-۵. نقش Zn در تکامل و عملکرد سلولهای T (ایمنی اختصاصی)		۳۰
۱-۴-۶. تأثیر مستقیم Zn بر روی سلولهای منونوکلئر خون محیطی		۳۳
۱-۴-۷. واکنش Zn با محرکهای سیستم ایمنی (Immuno Stimulants)		۳۳

۳۵	.....: Zn.۶-۲.تیمولین و Zn
۳۵	.....: Zn.۷-۲ و آپوپتوزیس:
۳۶	.....: Zn.۱-۷-۲ و مهار آپوپتوزیس:
۳۷	.....: ۲-۷-۲.آپوپتوزیس در تیموسیت‌ها:
۳۸	.....: ۲-۷-۲.آپوپتوزیس دیگر سلولهای لنفوئیدی:
۳۸	.....: ۲-۷-۴.آپوپتوزیس سلولهای تومورال:
۴۰	.....: ۲-۸-۲-مروری بر مطالعات انجام شده: نقش عنصر (Zn) بر روی سلولهای بدخیم خونی در invitro
۴۱	.....: ۲-۸-۲-۱.نوع مرگ سلولی تحت شرایط عدم حضور Zn
۴۲	.....: ۲-۹-۲-هدف از انجام این مطالعه:
۴۴	.....: فصل سوم: مواد و روشها
۴۵	.....: ۴-۱-۲-ابزار و مواد مورد نیاز
۴۵	.....: ۴-۱-۱-۳-ابزار مورد نیاز:
۴۶	.....: ۴-۱-۲-۲-مواد مورد نیاز:
۴۸	.....: ۴-۲-۲-آماده کردن محلولها و بافرها:
۴۸	.....: ۴-۲-۲-۱-طرز تهیه بافر نمکی PBS: PH: ۷/۲ - ۰/۰ مولار -
۴۸	.....: ۴-۲-۲-۲-طرز تهیه محلول محیط کشت RPMI-1640
۵۰	.....: ۴-۲-۲-۳-طرز تهیه محلول اسید سولفوکرومیک
۵۱	.....: ۴-۲-۳-۴-طرز تهیه محلول رنگ رایت - گیمسا:
۵۲	.....: ۴-۲-۳-۵-طرز تهیه محلول اصلی کلرید روی (ZnCl <sub>2</sub> )
۵۳	.....: ۴-۲-۳-۶-طرز تهیه محلول اصلی سولفات روی (II)
۵۳	.....: ۴-۲-۳-۷-طرز تهیه محلول رنگ تریپان بلو - (W/V: ۴/۰)
۵۴	.....: ۳-۳-مشخصات سلولهای MOLT-4 و RAJI و روش انجماد و ذوب کردن آنها:
۵۴	.....: ۳-۱-۳-۳-رده سلولی T (MOLT-4): خریداری شده از انسستیتو پاستور ایران
۵۵	.....: ۳-۲-۳-۲-رده سلولی B (RAJI): خریداری شده از انسستیتو پاستور ایران:
۵۶	.....: ۳-۳-۳-روش انجماد کردن سلولها:
۵۷	.....: ۳-۴-۳-۴-روش ذوب کردن سلولها:
۵۷	.....: ۳-۴-۴-روش کار:
۵۹	.....: ۳-۴-۱-آزمایش تریپان بلو:
۶۰	.....: ۳-۴-۲-سنجش Viability با M.T.T

۳-۴-۳-بررسی تکثیر سلولهای Molt-4 , Raji با MTT	۶۴ .....
۳-۴-۴-بررسی مورفولوژی سلولی با روش رنگآمیزی رایت گیمسا:	۶۸ .....
۳-۴-۵-رنگآمیزی اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج	۶۸ .....
فصل چهارم:نتایج	۷۰ .....
۴-۱-بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف Zinc بر روی میزان Viability سلولهای Trypanblue dye	۷۲ .....
بدخیم Raji و Molt-4i	۷۲ ساعت
۴-۲-بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف Zn بر میزان Viability سلولهای بدخیم Molt-4 و Raji در زمانهای انکوباسیون مختلف (M.T.T assay)	۷۴ .....
۴-۳-بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف Zn بر میزان Viability سلولهای بدخیم Molt-4 و Raji در فواصل زمانی مختلف (رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج)	۸۰ .....
۴-۴-بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت Zn بر مورفولوژی سلولهای بدخیم Raji و Molt-4 در زمانهای انکوباسیون (رنگ آمیزی رایت - گیمسا):	۸۴ .....
۴-۵-نتایج بررسی تکثیر سلولهای بدخیم Molt-4 و Raji در حضور غلظت‌های مختلف Zn و در فواصل زمانی (M.T.T assay)	۹۳ .....
فصل پنجم:نتیجه گیری، بحث، پیشنهادات	۹۷ .....
۵-۱-بحث و نتیجه گیری.	۹۸ .....
۵-۲-پیشنهادات:	۱۰۰ .....
منابع:	۱۰۶ .....

## فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱. مقادیر Zn در ارگانهای مختلف بدن	۹
جدول ۱-۲ . منابع غذایی Zn ( mg/100g )	۱۰
جدول ۱-۳. مقادیر توصیه شده روزانه(Zn) برای سنین مختلف(mg/day)	۱۱
جدول ۲-۱. نقش Zn در تعدادی از پروتئینهای حاوی (Zinc-finger-momotif)	۱۸
جدول ۲-۲. پارامترهای ایمنولوژیکی که در شرایط کمبود Zn کاهش می یابند	۲۳
جدول ۲-۳. چند مورد از بیماریهای که میتوان از Zn در درمان آنها استفاده نمود	۲۶
جدول ۳-۱. مشخصات سلولهای Molt-4 گرفته شده از ATCC	۵۵
جدول ۳-۲. مشخصات سلولهای Raji گرفته شده از ATCC	۵۵
جدول ۴-۱-۱ ساعت ۱۲ / Molt-4	۷۱
جدول ۴-۱-۲ ساعت ۲۴ / Molt-4	۷۱
جدول ۴-۱-۳ ساعت ۳۶ / Molt-4	۷۲
جدول ۴-۱-۴ ساعت ۴۸ / Molt-4	۷۲
جدول ۴-۱-۵ ساعت ۶۰ / Molt-4	۷۲
جدول ۴-۱-۶ ساعت ۷۲ / Molt-4	۷۲
جدول ۴-۲-۱ ساعت ۱۲ / Raji	۷۷
جدول ۴-۲-۲ ساعت ۲۴ / Raji	۷۷
جدول ۴-۲-۳ ساعت ۳۶ / Raji	۷۸
جدول ۴-۲-۴ ساعت ۶۰ / Raji	۷۸
جدول ۴-۲-۵ ساعت ۷۲ / Raji	۷۸
جدول ۴-۳-۱ ساعت ۱۲ / Raji	۸۱
جدول ۴-۳-۲ ساعت ۲۴ / Raji	۸۱
جدول ۴-۳-۳ ساعت ۳۶ / Raji	۸۱
جدول ۴-۳-۴ ساعت ۴۸ / Raji	۸۱
جدول ۴-۳-۵ ساعت ۶۰ / Raji	۸۱
جدول ۴-۳-۶ ساعت ۷۲ / Raji	۸۲

## فهرست نمودارها

صفحه	عنوان
۶۶.....	نمودار ۳-۴-۱. منحنی استاندارد (رابطه بین جذب نوری و تعداد سلول)
۶۷.....	نمودار ۳-۴-۲. منحنی استاندارد (رابطه بین جذب نوری و تعداد سلول)
۷۴ .....	نمودار ۴-۱-۱. نتایج تأثیر غلظت‌های متفاوت Zn در ساعات مختلف <sup>۱</sup> بر روی سلول‌های Molt-4 (آزمایش Zn Viability%)
۷۶...	نمودار ۴-۱-۲. نتایج تأثیر غلظت‌های متفاوت Zn در ساعات مختلف بر روی سلول‌های Raji (Trypan blue exclusion dye) %Viability
۷۹.....	نمودار ۴-۲-۱. نتایج تأثیر غلظت‌های متفاوت Zn در ساعات مختلف بر روی سلول‌های Raji (M.T.T assay) %Viability
۸۰ .. .	نمودار ۴-۲-۲. نتایج تأثیر غلظت‌های متفاوت Zn در ساعات مختلف بر روی سلول‌های Molt-4 (M.T.T assay) %Viability
۸۳.....	نمودار ۴-۳-۱. نتایج تأثیر غلظت‌های متفاوت Zn در ساعات مختلف بر روی سلول‌های Raji (AO&EB) %Viability
۸۴ ...	نمودار ۴-۳-۲. نتایج تأثیر غلظت‌های متفاوت Zn در ساعات مختلف بر روی سلول‌های Molt-4 (EB and AO) %Viability
۹۴.....	نمودار ۴-۵-۱. تکثیر سلول‌های Molt-4 بعد از ۱۲ ساعت در حضور غلظت‌های متفاوت Zn (M.T.T Assay)
۹۵.....	نمودار ۴-۵-۲. تکثیر سلول‌های Molt-4 بعد از ۲۴ ساعت در حضور غلظت‌های متفاوت Zn (M.T.T Assay)

۱. زمانهای انکوباسیون ۱۲ تا ۷۲ ساعت در آزمایشگاه

Zinc / ۰۱۰ تا ۵۰۰ میکرومولار عنصر

## فهرست شکلها

صفحه	عنوان
٥٤	شکل ۲-۱. ساختمان مولکولی تریپان بلو.
٦٠	شکل ۲-۲. نمای لام نئوبار زیر میکروسکوپ نوری
٦٢	شکل ۳-۳. ساختمان مولکولی MTT
٨٥	شکل ۴-۴-۱. سلول‌های شاهد Molt ، (بدون رنگ آمیزی) $\times 100$
٨٦	شکل ۴-۴-۲. سلول‌های شاهد Molt-4 (رايت - گيمسا) $\times 100$
٨٧	شکل ۴-۴-۳. سلول‌های بدخیم Molt-4 ( $24 \mu m / 24 \text{ عنصر Z}$ ) رايت - گيمسا. $x100$
٨٨	شکل ۴-۴-۴. سلول‌های بدخیم Molt-4 ( $24 \mu m / 24 \text{ عنصر Z}$ ) رايت - گيمسا. $x100$
٨٩	شکل ۴-۴-۵. سلول‌های شاهد Raji (رايت - گيمسا) $x100$
٩٠	شکل ۴-۴-۶. سلول‌های بدخیم Raji، ( $24 \mu m / 24 \text{ عنصر Zn}$ ) (رايت - گيمسا) $x40$
٩١	شکل ۴-۴-۷. سلول‌های بدخیم Raji ، ( $24 \mu m / 24 \text{ عنصر Zn}$ ) ، (رايت - گيمسا) $x100$
٩٢	شکل ۴-۴-۸. سلول‌های شاهد Molt-4 با رنگ آمیزی (EB&AO).
٩٣	شکل ۴-۴-۹. تغييرات مورفولوژيکي سلول‌های Molt-4 بعد از ۱۲ ساعت در حضور غلظت $(Zn / 200 \mu m)$ (EB&AO)
٩٦	شکل ۴-۵-۱. تكثير سلول‌های Molt-4 بعد از ۱۲ و ۲۴ ساعت در حضور غلظت‌های $(Zn / 0.01 \mu m \text{ و } 0.05 \mu m)$ (رايت - گيمسا) $x100$

## فصل اول

### مقدمہ

## ۱-۱. کلیات عناصر کمیاب (Trace-Elements)

عناصر کمیاب برای بیان عناصری بکار می‌رود که در مقدادیر بسیار جزئی در بدن موجودات زنده وجود دارند و نقش مهمی در اعمال حیاتی موجودات زنده بهره‌دارند.

عناصر کمیاب از جمله آهن (Fe)، مس (Cu) و روی (Zn) در غلظت‌های بسیار پایین در اکثر بافت‌های بدن انسان و حیوانات زنده یافت می‌شود. مقدادیر مورد نیاز روزانه به این عناصر کمیاب در حد میکروگرم یا نانوگرم است. این عناصر دارای نقش حیاتی در بدن انسان و حیوانات بوده و برای رشد، بقاء حیات و سلامتی بدن موجودات زنده مورد نیاز می‌باشند. در اثر فقدان دائمی این عناصر اختلالات عملکردی متعددی بسته به نوع عنصر و مکانیزم‌های وابسته به آن در بدن آشکار شده و گاهی اوقات به مرگ منجر می‌شود.

عناصر کمیاب دارای ناقل‌های هستند که دارای جایگاه‌های ویژه برای عنصر خاصی که وارد بدن می‌شود بوده و پس از شناسایی و اتصال به این عناصر در محلهای مناسب رهایشان می‌کنند. ترانسفرین<sup>۱</sup> و فریتین<sup>۲</sup> ناقلین آهن، آلبومین و  $\alpha_2$ -ماکروگلوبولین‌ها<sup>۳</sup> رهایشان می‌کنند. سرولوپلاسمین<sup>۴</sup> ناقل مس است. بطور مفصل در این پژوهش نقش و اهمیت Zn ناقلین و سرولوپلاسمین<sup>۴</sup> از عناصر کمیاب آمده است [۱، ۲، ۳].

(در سیستمهای بیولوژیکی) به عنوان یکی از عناصر کمیاب آمده است [۱].



۱. Transferin

۲. Feritin

۳.  $\alpha_2$ -Macroglobulins

۴. Ceruloplasmin