



دانشگاه تبریز
سازمان آموزشی و تحصیلات تکمیلی

دانشکده علوم

گروه آموزشی زیست‌شناسی

پایان نامه برای دریافت درجه ی کارشناسی ارشد
در رشته زیست‌شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری

بررسی اثرات نانو ذرات اکسید روی تهیه شده با عصاره گیاه *Alcea aucheri* بر ترمیم زخم در موش های صحرایی

پژوهشگر:

سیاوش توگلی کیوی

اساتید راهنما:

دکتر ابوالفضل بایرامی

پروفسور صابر زهری

اساتید مشاور:

دکتر شیما رحیم پوران

فرید محمدی اروانق

خرداد ماه ۹۸

عنوان و نام پدیدآور:	بررسی اثرات نانوذرات اکسید روی تهیه شده با عصاره گیاه <i>Alcea aucheri</i> بر ترمیم زخم در موش های صحرایی / سیاوش توگلی کیوی
استادان راهنما:	دکتر ابوالفضل بایرامی، پروفیسور صابر زهری
استادان مشاور:	دکتر شیمارحیم پوران، فرید محمدی اروانق
تاریخ دفاع:	۹۸/۳/۱۲
تعداد صفحات:	۹۸ ص.
شماره پایان نامه:	زیست شناسی /

چکیده:

هدف: با توجه به تاثیرات مثبت گیاهان دارویی در کنترل و درمان بیماری‌ها و همچنین پیشرفت روز افزون علوم جدید مانند نانو تکنولوژی، می توان با ترکیب علوم سنتی و جدید، راه کارهای مؤثری در کنترل و درمان بیماری‌ها بدست آورد. لذا در این تحقیق، هدف کمک به درمان زخم با استفاده از نانوذرات اکسید روی تهیه شده با عصاره گیاه ختمی می باشد. گیاه ختمی به عنوان یک گیاه کاهنده التهاب و آنتی اکسیدان مطرح است. نانوذرات اکسید روی دارای خواص ضد باکتری، ضد التهابی و ضد عفونی کننده هستند که به طور گسترده‌ای در تولید کرم‌های پوستی استفاده می‌شود.

روش شناسی پژوهش: در این پژوهش عصاره آبی گیاه ختمی تهیه شد. نانوذرات اکسید روی نیز به صورت شیمیایی سنتز شدند. همچنین نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره آبی ختمی سنتز شده و آماده استفاده شدند و اثرات آنها بر میزان ترمیم زخم القا شده در موش ها، مورد بررسی قرار گرفت. ویژگی‌های ساختاری نانوذرات با استفاده از آنالیزهای *FT-IR*, *UV-vis DRS*, *TGA*, *XRD*، *BET* و *SEM* بررسی شدند. ۴ گروه موش صحرایی نژاد ویستار (در هر گروه $n = 5$) تیمار شدند. بعد از ایجاد زخم در پوست موش ها، به مدت ۱۸ روز تحت تاثیر عصاره و نانوذرات تهیه شده قرار گرفتند. هر سه روز یکبار پانسمان زخم ها تعویض و تصویربرداری انجام شد. تغییرات پیشرونده در ناحیه زخم هر ۶ روز یکبار و به مدت ۱۸ روز ثبت شد. در پایان روز های ششم، دوازدهم و هجدهم، از محل زخم یکی از موش های هر گروه، نمونه برداری صورت گرفته و برای رنگ آمیزی های هماتوکسیلین-انوزین و ماسون-تری کروم مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: اندازه نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش زیستی، ۱۷٫۵ نانومتر تعیین شد که نسبت به نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش شیمیایی (۱۹ نانومتر) کاهش اندازه را نشان می‌دهد. همچنین تکنیک‌های *FT-IR* و *UV-vis DRS*, *TGA* حضور مولکول‌های عصاره گیاهی به همراه اکسید روی تهیه شده را تأیید نمودند. نتایج نشان دهنده کاهش معنی دار اندازه زخم در موش‌های تیمار شده با نانوذره تهیه شده با عصاره ختمی نسبت به گروه کنترل است.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل، می توان نتیجه گیری کرد که تلفیق علوم سنتی و جدید، تاثیر معنی داری در تسریع بهبودی زخم ایجاد کرده است

واژه‌های کلیدی: نانوذرات اکسید روی - *Alcea aucheri* - ترمیم زخم- سنتز سبز

۱- مقدمه و هدف

۱-۱- نانوذره

۱-۱-۱- تعریف نانو ذره

ذره ای که ابعاد آن 10^{-9} تا 10^{-7} متر باشد. و در ابتدا از کلمه یونانی کوتوله^۱ گرفته شده است. اگر بخواهیم مفهوم آن را خوب درک کنیم و با مثال فیزیکی یا زیستی تعیین کنیم قرار گرفتن ۳ اتم در کنار هم یک نانومتر یا DNA جانداران یک رشته ۲/۵ نانومتری می باشد. یا ویروس HIV، ۱۲۵ نانومتر و یک تار موی انسان در حدود ۱۰۰،۰۰۰ نانومتر می باشد. یک پروتئین ۵۰ نانومتر ضخامت دارد. مواد در اندازه نانو، خواص متفاوتی در ابعاد ماکرو داشته که علت آن سطح تماس زیاد می باشد. نانو ذرات به عنوان رابطی بین مواد توده‌ای^۲ و سازه‌های اتمی یا مولکولی یاد می شود. مواد توده‌ای و حجیم دارای خواص فیزیکی ثابت (بدون در نظر گرفتن اندازه آن‌ها) هستند، اما در مقیاس نانو ویژگی ثابت بودن خواص اغلب اتفاق نمی افتد (Thakkar et al, 2010). ویژگی مواد با ویژگی نانو مواد به علت داشتن سطح تماس زیاد بسیار متفاوت می باشد. از نانوذرات فلزی استفاده های مختلفی در زمینه هایی مانند الکترونیک، لوازم آرایشی، انواع پوشش‌ها، صنایع بسته بندی، زیست فناوری و دارویی می شود. به عنوان مثال، نانوذرات می توانند با یک ماده جامد در دمای نسبتاً پایین و اغلب بدون ذوب، به علت سطح تماس زیاد، ادغام شوند و منجر به بهبود سریع و آسان پوشش‌ها برای کاربردهای الکترونیکی شوند. نانوذرات فلزی می توانند به رشته DNA به صورت غیر مخرب اتصال و باعث بیان یا عدم بیان یک ژن شوند. این گونه اتصالات کاربردهای فراوانی در پزشکی تشخیصی و درمانی دارند. همچنین نانوذرات را می توان از طریق جای گذاری در عروق یا اندام هدف به صورت موضعی در جهت تصویربرداری، درمان و یا کاربردهای زیست پزشکی، استفاده کرد (Thakkar et al, 2010).

۱-۱-۲- تاریخچه نانوذره

بشر در ابتدا در این فکر بود که ذرات سازنده مواد چه هستند و مواد تا چه اندازه می توانند ریز و خرد شوند. شاید دموکریتوس، فیلسوف یونانی که حدود ۴۰۰ سال قبل از

میلااد مسیح می‌زیسته و از واژه اتم به معنی تقسیم نشدنی استفاده کرده است را بتوان بنیانگذار فناوری نانو دانست (Horikoshi and Serpone, 2013).

شاید اولین نانوتکنولوژیست‌ها شیشه‌گران قرون وسطایی بودند که از قالب‌های قدیمی برای شکل دادن شیشه‌هایشان استفاده می‌کرده‌اند. این شیشه‌گران نمی‌دانستند که چرا با اضافه کردن طلا و نقره و یا فلزات دیگر به شیشه رنگ آن تغییر می‌کند. در آن زمان برای ساخت شیشه‌های کلیساهای قرون وسطایی از ذرات نانومتری طلا استفاده می‌شده است و با این کار شیشه‌های رنگی بسیار جذابی به دست آمده است. رنگ به وجود آمده به علت سطح تماس زیاد نانوفلزاتی مانند طلا و نقره می‌باشد؛ زیرا که مواد با ابعاد نانو دارای همان خواص مواد با ابعاد میکرو یا ماکرو نمی‌باشد. رنگدانه‌های تزئینی جام مشهور لیکرگوس در روم باستان (قرن ۴ بعد از میلاد) نمونه‌ای از آن‌ها است. که بسته به جهت نور تابیده به آن رنگ‌های متفاوتی دارد. نور انعکاس یافته از آن سبز است ولی اگر نور از درون آن بتابد به رنگ قرمز دیده می‌شود. آنالیز این شیشه‌ها حکایت از وجود مقادیر بسیار اندکی از بلورهای فلزی زیر ۷۰۰ نانومتر دارد که حاوی نقره و طلا است. حضور این نانوبلورها باعث رنگ ویژه‌ی جام لیکرگوس شده، بنابراین تاریخ نانوذرات مسن‌تر از فناوری نانو است (Horikoshi and Serpone, 2013).

۳-۱-۱- دسته بندی نانوذرات

به طور کلی نانوذرات را می‌توان در دو دسته قرار داد که عبارتند از: غیرآلی و آلی. نانوذرت غیر آلی مانند، نانوذرات فلزات نجیب (مثل طلا و نقره)، نانوذرات مغناطیسی و یا از نوع نیمه هادی (همانند تیتانیوم دی‌اکسید و اکسیدروی) باشند. ولی نانوذرات آلی مانند نانوذرات کربنی (فولرن‌ها) هستند. در این میان نانوذرات غیر آلی بیشتر مورد توجه هستند چرا که این مواد ویژگی‌های خاصی داشته و تنوع عملکردی بالایی دارند. به علت خواص مربوط به اندازه‌شان و پیشرفت‌های موجود در زمینه‌ی داروهای شیمیایی مخصوص تصویر برداری و برخی دیگر از داروها، نانوذرات غیرآلی به عنوان ابزارهایی با پتانسیل بالا برای اهدافی چون تصویربرداری در پزشکی و همچنین درمان بیماری‌ها بیشتر مورد توجه هستند. استفاده‌ی گسترده و روزافزون این نانوذرات در پزشکی (در انتقال سلولی به علت خواص متنوع آن‌ها همانند در دسترس بودن، قدرت عملکردی بالا، زیست سازگاری، توانایی در انتقال هدفمند دارو و رهاسازی کنترل شده دارو) می‌باشد (Xu et al, 2006).

۲-۱- نانو تکنولوژی

نانوفناوری^۳ رشته‌ای از دانش کاربردی و فناوری نانو است که حوزه‌های مختلفی را شامل می‌شود و اصلی‌ترین مبحث آن، کنترل ماده و دستگاههایی که در ابعاد یک صدم میکرو یا همان نانو کار می‌کنند. در واقع نانوفناوری فهم و به کارگیری خواص جدیدی از مواد و سیستم‌هایی در ابعاد نانو متر است که اثرات فیزیکی جدیدی عمدتاً متأثر از غلبه خواص کوانتومی بر خواص کلاسیک به علت سطح تماس زیاد از خود نشان می‌دهند. فناوری نانو موج چهارم انقلاب صنعتی، پدیده‌ای عظیم است که در تمامی گرایش‌های علمی راه یافته و از فناوری‌های نوینی است که با سرعت هر چه تمام‌تر در حال توسعه است و آینده بشر را تغییر می‌دهد و انسان با فناوری نانو، در واقع ذرات را از نو برای کاربردهای مورد نیاز خود با کارایی بالا می‌سازد. از ابتدای دهه‌ی ۱۹۸۰ میلادی گستره-ی طراحی و ساخت ساختمان‌ها هر روزه شاهد نوآوری‌های جدید در زمینه مصالح کارآمدتر و پربازده‌تر در مقاومت، شکل‌پذیری، دوام و توانایی بیش‌تر نسبت به مصالح سنتی است. نانوفناوری یک دانش میان رشته‌ای است و در تمامی رشته‌ها کاربرد دارد و به رشته‌هایی چون مهندسی مواد، پزشکی، داروسازی و طراحی دارو، دام‌پزشکی، زیست-شناسی، فیزیک کاربردی، ابزارهای نیمه رسانا، شیمی ابرمولکول و حتی مهندسی مکانیک، مهندسی برق و مهندسی شیمی نیز مربوط می‌شود. در واقع فناوری نانو توانایی ساخت، کنترل و استفاده‌ی ماده در ابعاد نانومتری برای کاربردهای مورد نظر و دقیق است. اندازه‌ی ذرات در فناوری نانو بسیار مهم است، چون سطح تماس مواد تغییر می‌کند و این سطح تماس در مقیاس نانویی، در خصوصیات آن بسیار تأثیرگذار است و خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی تک تک اتم‌ها و مولکول‌ها با خواص توده‌ای ماده متفاوت است. این اندازه در مواد مختلف متفاوت است، اما به طور معمول مواد نانو به موادی که حداقل یکی از ابعاد آن‌ها کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر باشد گفته می‌شود (علی‌زاده و عابدینی، ۲۰۱۰).

انسان با پیشرفت دانشش درباره نانو و یافتن کاربردهای جدید نانو ذرات و نانو مواد به علت خواص بهبود یافته و کاملاً جدید آن می‌باشد که مربوط به اندازه و مورفولوژی و نحوه‌ی توزیع نانو مواد در سطح اجسام می‌شود. به عنوان نمونه نانوفناوری در زمینه-هایی چون حفظ سلامت، صنایع آرایشی، مواد غذایی و تغذیه، مهندسی ژن و انتقال ژن و

دارو، محیط زیست، پزشکی، مکانیک، صنایع شیمیایی، الکترونیک، صنایع فضایی، و غیره در حال پیشرفت است (Khalil et al, 2013).

هنگاهی که ریچارد فایمن، اولین بار در این مورد سر میز شام صحبت کرد و گفت در آن پایین فضاهای زیادی وجود دارد، کسی فکر نمی کرد که این فناوری این همه زندگی روزمره انسانها را تغییر داده و تحت تاثیر قرار دهد و به عنوان یک علم و یکی از مهمترین بخش‌های پژوهشی و توسعه یافتگی کشورها تلقی شود و کشورها برای مبنا طبقه بندی شوند مخصوصاً در پزشکی و زیست شناسی. پس هدف فناوری نانو، کنترل بر تک تک مولکول‌ها و اتم‌ها، برای بازآیی و تشکیل جسم مورد نظر، برای کاربرد های دقیق تر می باشد. فناوری نانو، توانایی فعالیت در مقیاس اتم به اتم و مولکولی، برای تولید ساختارهای بزرگ‌تر، با نظم و خصوصیات مولکولی جدید برای کنترل ساختار و تولید وسایل در سطح اتمی، مولکولی و درشت مولکولی و استفاده‌ی مؤثر و دقیق تر از آنها تعریف شده است. به طور خلاصه، فناوری نانو توانایی ساخت مواد ریز و درشت با دقت اتمی است (رحیمی و همکاران، ۱۳۹۳). حوزه‌ی فناوری نانو توجه زیادی را در زمینه گسترش بیوتکنولوژی، الکترونیک، هواضا و کامپیوتر به خود جلب کرده است. اخیراً "فناوری نانو در حوزه‌ی نانوپزشکی و زیست شناسی کاربرد دارد. فناوری نانو در سه سطح قابل بررسی است که شامل مواد، ابزارها و سیستم‌ها. در حال حاضر در سطح مواد، پیشرفت‌های بیشتری نسبت به دو سطح دیگر حاصل شده است (Khanna et al, 2008).

۳-۱- نانوبیوتکنولوژی

نانوبیوتکنولوژی اصطلاحی است که به تازگی ابداع شده است و باعث همگرایی بین دو جهان مهندسی و بیولوژی مولکولی است. نانوتکنولوژی عبارتند از «تحقیق و توسعه فناوری در سطح اتم‌ها و مولکول‌ها با اندازه‌ای در حدود 10^{-1} نانومتر جهت دستیابی به درک اساسی از پدیده‌ها و مواد در سطح نانو و ساخت و استفاده از ساختارها، وسایل و سیستم‌هایی که دارای ویژگی‌ها و عملکرد جدید به دلیل داشتن اندازه کوچک می‌باشند. در حقیقت نانوتکنولوژی مجموعه‌ای از فناوری‌ها است که به صورت انفرادی یا هم جهت در به کار گیری مفهوم نانو به پیشرفت‌های بیشتری دست خواهد یافت. یک تعریف کلاسیک از تعامل بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی به صورت زیر بیان می‌گردد «بیوتکنولوژی به نانوتکنولوژی مدل ارائه می‌دهد در حالی که نانوتکنولوژی با در اختیار گذاشتن ابزار برای بیوتکنولوژی آن را برای رسیدن به اهدافش یاری می‌رساند». اما

تعامل بین بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی که به عنوان نانوبیوتکنولوژی مطرح است بیش از این تعریف می‌باشد. نانوبیوتکنولوژی، استفاده از قابلیت‌های نانوتکنولوژی در کاربردهای زیستی آن است (Manjasetty et al, 2008).

- ۱- ساخت سیستم‌هایی به منظور رهایش دارو در بدن
 - ۲) ساخت قطعات سازگار برای جایگزینی اعضای بدن
 - ۳) بیوسنسورهایی به منظور آزمایشگاه‌های کامل طراحی شده روی یک تراشه بسیار کوچک
 - ۴) تشخیص همزمان چندین بیماری از روی یک قطره خون (براساس تشخیص از روی DNA)
 - ۵) ساخت یک مولکول بیولوژی ناروماتیک از DNA
 - ۶) ساخت ابزارهای نانومتری بر پایه DNA.
- در طبیعت نیز نمونه‌هایی از استفاده نانو در خلقت دیده می‌شود مثلاً خیس نشدن برگ‌های لاله آبی در آب و یا قدم زدن مارمولک در روی سقف بدون افتادن که علت آن داشتن سطح تماس زیاد پای مارمولک با سقف بوده طوریکه اگر سقف با فناوری نانو پوشش داده شود، پای مارمولک لیز می‌خورد و می‌افتد.

۴-۱- روش‌های سنتز نانوذرات

به طور کلی، نانوذرات به دو روش سنتز می‌شوند: پایین به بالا^۴ و بالا به پایین^۵. روش پایین به بالا و یا خودسامانی، اشاره به سنتز و ساخت یک ساختار به طریق اتم به اتم، مولکول به مولکول یا خوشه به خوشه دارد. در این روش، ابتدا ساختمان کلی نانو ساختار یا نانوذره شکل می‌گیرد و پس از آن، ماده نهایی را با استفاده از مواد شیمیایی و یا زیستی تولید می‌کنند. مزیت متمایز در روش پایین به بالا، امکان تولید نانوذرات با نقص نسبتاً کمتر می‌باشد. در این روش احتمال به دست آوردن ترکیبات شیمیایی همگن افزایش می‌یابد. در روش بالا به پایین، اندازه مواد توده‌ای و حجم، با استفاده از روش‌های فیزیکی (به عنوان مثال، مکانیکی) و یا مواد شیمیایی، کاهش می‌یابد. در روش‌های بالا به پایین نقص در ساختار سطحی ماده تولید شده، مشاهده می‌شود. چنین نقص‌هایی در ساختار سطحی می‌تواند تأثیر قابل توجهی در خواص فیزیکی و شیمیایی

1-Bottom-up

2-Top-down

نانوساختار، بگذارند (Thakkar et al, 2010). روش‌های مختلفی از جمله ساییدگی و تجزیه در اثر حرارت معمولاً می‌تواند برای سنتز فیزیکی نانوذرات فلزی استفاده گردد. در ساییدگی، اندازه ذرات ماکرو یا میکرو توسط یک مکانیسم کاهنده اندازه، کاهش می‌یابد. قابل ذکر است که میزان تولید ماده نهایی در روش‌های فیزیکی برای دستیابی به سنتز نانوذرات فلزی بسیار کم است و مهم‌تر از همه، این روش‌ها هزینه بسیار بالایی دارند و دستگاه‌های مربوطه گران قیمت هستند. از روش‌های مرسوم شیمیایی که به طور گسترده برای سنتز نانوذرات استفاده می‌شود، استفاده از روش شیمیایی مرطوب است. معمولاً در این روش رشد نانوذرات در یک محیط مایع حاوی معرف‌های مختلف و عوامل کاهنده خاص، انجام می‌شود. به طور کلی، روش‌های شیمیایی در حجم‌های بالا، کم هزینه هستند؛ با این حال، معایبی نیز دارند، مانند آلودگی حاصل از مواد شیمیایی، استفاده از محلول‌های سمی و تولید محصولات پرخطر. از این‌رو، نیاز روزافزون به توسعه روش‌های غیر سمی، کم هزینه و سازگار با محیط زیست برای سنتز نانوذرات فلزی لازم و ضروری می‌باشد (Thakkar et al, 2010).

۱-۴-۱- سنتز شیمیایی نانوذرات

این روش به برهم کنش شیمیایی بین مواد وابسته بوده و نانوذرات ایجاد شده از محیط جدا می‌شود. روش‌های کلی عبارتند از واکنش‌هایی که در محلول آبی یا غیر آبی حاوی نمک‌ها و یا مواد محلول انجام می‌پذیرد. پس از این که محلول از حل شونده اشباع شد، با تغییر از حالت اشباع به فوق اشباع، از طریق کاهش حجم حلال (به وسیله گرما دادن)، رسوب دهی یا تشکیل کریستال صورت می‌گیرد. بنابراین غلظت واکنش دهنده‌ها، دمای واکنش، pH محیط و نسبت افزایش واکنش دهنده‌ها به محیط واکنش، بر توزیع اندازه و خلوص فیزیکی محصول است (Hasan, 2015).

۱-۴-۲- سنتز زیستی نانوذرات

در حال حاضر انواع روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای سنتز نانو ذرات مختلف وجود دارد. در قرن نوزدهم دانشمندان متوجه شدند که موجودات و مواد بیولوژیکی (زیستی) می‌توانند پیش‌سازهای فلزی را کاهش دهند، اما مکانیسم آن‌ها هنوز در هاله‌ای از ابهام است.

پیشرفت و کارآمدی روش سنتز سبز^۶ در به کارگیری از کاهنده‌های طبیعی و مواد بیولوژیکی، تثبیت مواد نهایی بدون استفاده از عوامل سمی، استفاده نکردن از مداد شیمیایی گران قیمت و مصرف انرژی کم، می‌باشد. به همین دلایل محققان نسبت به استفاده از روش‌های بیولوژیکی تمایل زیادی دارند (Arumugama et al, 2015).

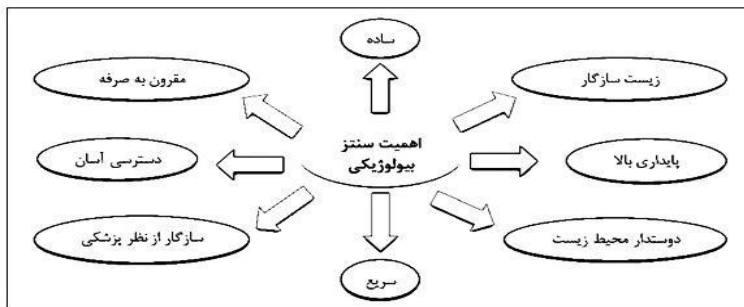
ذرات تولید شده در روش سنتز سبز (سنتز زیستی) متفاوت از روش‌های فیزیکی و شیمیایی است. سنتز سبز، در واقع یک رویکرد پایین به بالا می‌باشد ولی در آن یک ماده شیمیایی گران قیمت به عنوان حلال و نیز کاهنده عمل می‌کند اما در سنتز زیستی عصاره طبیعی محصولات زیستی مانند برگ درختان و یا میوه‌ها برای سنتز استفاده می‌گردد. با توجه به توضیحات داده شده، موجودات زیستی دارای پتانسیل بسیار زیادی برای تولید نانوذرات هستند (Hussain et al., 2016) (شکل ۱-۱).

بیوسنتز نانوذرات از میکرواورگانیسم‌ها، یک فناوری سازگار با محیط زیست است. میکرواورگانیسم‌های متنوع از هر دو گروه پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها برای سنتز نانوذرات فلزی از جمله نقره، طلا، پلاتین، پالادیم، آهن، کادمیم و اکسید فلزاتی مانند تیتانیم دی‌اکسید و روی‌اکسید و... استفاده می‌شود. این میکرواورگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، اکتینومیست‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها هستند. این روش شامل انتقال یون‌ها به سلول‌های میکروبی است تا نانوذرات در حضور آنزیم‌ها شکل بگیرد (Hasan, 2015).

۱-۲-۴-۱- استفاده از باکتری‌ها در سنتز زیستی نانوذرات

باکتری‌های پروکاریوتی برای سنتز نانوذرات به صورت گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. یکی از دلایل برای ترجیح باکتری‌ها برای سنتز نانوذرات، سهولت نسبی خود ترمیمی آن‌ها می‌باشد. این مورد در یکی از اولین مطالعات مربوط به این فناوری، در مطالعات اسلاسون و همکاران، گزارش گردید (Slawson et al, 1992).

آن‌ها در مطالعات خود توانستند نوعی باکتری مقاوم در برابر نقره (جدا شده از معادن نقره)، *Pseudomonas stutzeri* AG259، و انباشته شده در فضای پری پلاسمی نانو ذرات نقره را، دریابند. در گزارش جداگانه از سنتز نانوذرات باکتریایی، واتسون و همکاران (Watson et al, 1990)، نشان دادند که باکتری‌های احیا کننده سولفات، بر روی سطح خود نانوذرات آهن سولفید (FeS) با خاصیت مغناطیسی بالا، سنتز می‌نمایند.



شکل ۱-۱: اهمیت سنتز بیولوژیکی (Ahmad et al, 2017)

۲-۲-۴-۱- استفاده از قارچ‌ها در سنتز زیستی نانو ذرات

قارچ‌ها در حال حاضر به دلیل تحمل و توانایی تجمع زیستی فلزات، برای تولید نسلی از نانوذرات، مورد مطالعه قرار می‌گیرند. مزیت متمایز استفاده از قارچ در سنتز نانوذرات، تولید در مقیاس بالا (به عنوان مثال با استفاده از روش تخمیر بستر جامد نازک) است. مزایای دیگر استفاده از قارچ‌ها برای تولید نانو ذرات فلزی شامل کارایی اقتصادی بالا و سهولت در اداره زیست توده است (Thakkar et al, 2010).

۳-۲-۴-۱- استفاده از گیاهان در سنتز زیستی نانو ذرات

در حال حاضر، ضمن مطالعه درباره میکرواورگانیسم‌ها مانند انواع قارچ‌ها و باکتری‌ها برای ساختن نانو ذرات، استفاده از گیاهان و عصاره‌های آن به عنوان بیوسنتز نانو ذرات هم جذاب و هم ناشناخته می‌باشد. استفاده از بافت‌های گیاهان و عصاره آن‌ها که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است، از روش‌هایی است که به صورت فراوان کاربرد دارد. استفاده از عصاره‌های گیاهی در مقایسه با بافت‌های گیاهی برای تولید نانوذرات، ساده‌تر است. چون امروزه تولید نانوذرات با استفاده از عصاره‌های گیاهی بسیار مورد توجه است. مراحل تولید نانوذرات با استفاده از عصاره‌های گیاهی به آسانی قابل اندازه‌گیری است و نسبت به فرآیندهای میکروبی و... ارزان‌تر است. عصاره‌های گیاهی ممکن است هم به عنوان عوامل کاهنده و هم کنترل کننده رشد نانوذرات در سنتز نانوذرات، عمل نمایند. نوع عصاره با توجه به ویژگی‌های شناخته شده نانوذرات گزینش می‌شود. چون که عصاره‌های مختلف حاوی غلظت‌ها و ترکیب‌های متفاوت از مواد گوناگون آلی هستند (Mittal et al., 2013).

۵-۱- نانوذرات اکسید روی (ZnO)

خواص منحصر به فرد و شگفت انگیز نانو ساختارها انگیزه فوق‌العاده‌ای در میان دانشمندان برای مطالعه، کشف و استفاده از آن‌ها در صنعت و پزشکی، ایجاد کرده است. نانوساختارهای اکسیدروی یکی از مواد امیدوار کننده برای ساخت حسگرهای زیستی و شیمیایی با توجه به داشتن خواص جالب و متنوع از جمله زیست سازگاری، غیر سمی بودن، ثبات شیمیایی و فتوشیمیایی، شفافیت نوری، فعالیت‌های الکتروشیمیایی، ارتباط الکترونی بالا و... است (Ahmad et al, 2011).

۱-۵-۱- اهمیت زیست-پزشکی روی

عنصر «روی» به علت شرکت در ساختار بیش از سیصد نوع آنزیم، نقش اصلی و کلیدی را در انواع متابولیسم زیستی عهده دار است (Umrani and Paknikar, 2014). و عنصر «روی» به عنوان عناصر معدنی ضروری است که در ساختار DNA تمام سلول‌های بدن باعث پایداری آن می‌شود. حدود ۷ درصد پروتئین‌ها در گیاهان و جانوران از جمله حدود ۲۱۱ متالوآنزیم برای عملکرد خود، به «روی» نیاز دارند. همچنین «روی» دارای اثرات مهمی بر تقویت فعالیت‌های تولیدمثلی در هر دو جنس نر و ماده است. نقش مستقیم آن در رشد، بلوغ و آزادسازی اووسیت از طریق تأثیر بر تولیدهورمون‌های استروژن و پروژسترون ثابت شده است (پریور، ۱۳۹۴). نانو ذرات اکسیدروی دارای اثرات ضدسرطانی، ضد میکروبی و فعالیت‌های پاداکسنده هستند. نانو ذرات اکسید «روی» به خاطر خصوصیات منحصر به فرد نوری، کاتالیزوری و نیمه هادی بودن به صورت فراوان ساخته شده و در حوزه‌های گوناگون فناوری به کار گرفته می‌شوند، (Pirhashemi & Akhundi, Shaker-Agjekandy & Habibi-Yangjeh, 2016; Habibi-Yangjeh, 2017; & Habibi-Yangjeh, 2015).

این ذرات نیز به عنوان مکمل تغذیه‌ای در مولتی ویتامین‌ها به مصرف می‌رسند. نانوذرات اکسیدروی در عین مفید بودن موجب سرطان روده‌ی بزرگ می‌شوند که به اندازه‌ی ذرات و تماس مستقیم نانوذرات با روده وابسته است (Martirosyan and Schneider, 2014). از مطالعات چنین استنباط می‌شود که املاح «روی» از طریق استنشاق، پوست و دستگاه گوارش وارد بدن می‌شوند و می‌توانند موجب تهوع، مسمومیت، استفراغ و آسیب‌های پوستی و ریوی می‌شود. استفاده از نانوذرات اکسیدروی در محصولات آرایشی و بهداشتی بسیار مرسوم بوده و باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد در پوست شده و به DNA و پروتئین‌های این سلول‌ها آسیب می‌زنند و در نهایت منجر به

سرطان می شوند. در باره نانوذرات اکسیدروی فاکتورهای اصلی اندازه، ویژگی‌های سطحی، انحلال‌پذیری و روش‌های مواجهه، مورد توجه است (علیپور و همکاران، ۱۳۹۳).

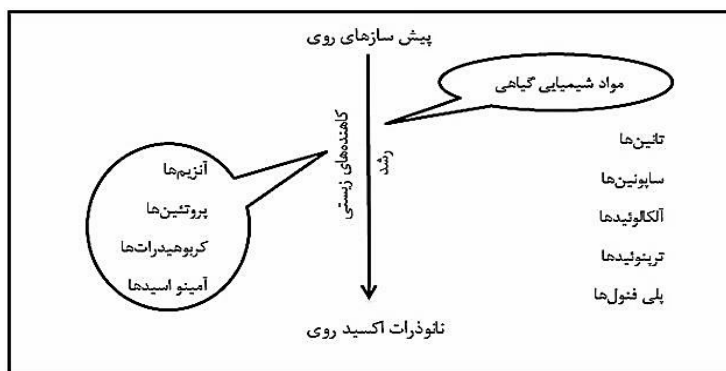
۲-۵-۱- اهمیت اکسید روی در بهبود زخم

اکسیدروی یک عامل ضد باکتری غیر ارگانیک است که نسبت به عوامل ارگانیک پایدارتر است. «روی»، که عمر طولانی در سلول‌های زنده دارد، یک عنصر شیمیایی است که برای بهبود زخم، به ویژه در بهبود زخم‌های مزمن و زخم‌های ناشی از سوختگی مهم است. گزارش شده است که استفاده موضعی «روی» به کاهش التهاب، بهبود مجدد اپیتلیالیزاسیون و کاهش رشد باکتری‌ها در زخم‌های مزمن باعث می‌شود. «روی» به عنوان عامل متالوپروتئینازی، نقش مهمی در بازسازی ماتریکس خارج سلولی^۷ دارد. نانوذرات اکسید روی دارای خواص ضد باکتری، ضد التهابی و ضد عفونی کننده هستند که به طور گسترده‌ای در تولید لوازم آرایشی و کرم‌های پوستی استفاده می‌شود (Bangale et al, 2012). فعالیت ضد باکتریایی آنها با کاهش اندازه ذرات افزایش می‌یابد.

اثر پماد زخم حاوی نانوذرات ZnO بر اندازه و غلظت نانوذرات استوار است. اکسیدروی با توجه به اندازه کوچک و نسبت سطح آن به حجم بیشتر، فعالیت ضد باکتری بالقوه‌ای دارد. هنگامی که ZnO با هیدروژل-کیتوزان تهیه شده باشد، با توجه به اثرات ضد باکتری، این ماده را یک ماده مناسب جهت تهیه پوشش‌های بهبود دهنده زخم می‌کند. فرمولاسیون نانوذرات اکسید روی، استفاده از آن را به عنوان یک پلیمر زیست سازگار اثربخشی این ماده را در دوزهای پایین تر، می‌تواند افزایش دهد. علاوه بر این، «روی» همچنین به عنوان یک تنظیم کننده برای مهاجرت کراتینوسیت و فاگوسیتوز خودکار عمل می‌کند، که برای ترمیم زخم طبیعی ضروری است. ZnO یک فرایند دو طرفه دارد که یون‌های Zn را از نانومواد آزاد می‌کند. در ابتدا، هنگامی که یون‌های Zn در تماس با مایعات بیولوژیکی قرار می‌گیرند، از دست دادن سریع آب به منظور تشکیل هیدراته ZnO انجام می‌شود که به عنوان یک عامل ضدباکتری عمل می‌کند. (Păunica-Panea et al, 2017).

۳-۵-۱- سنتز زیستی نانوذرات اکسید روی

بیوسنتز نانوذرات اکسیدروی، روشی آسان و دوست‌دار محیط زیست است که بدون دخالت هرگونه ماده شیمیایی خطرناک، انجام می‌گیرد. در سنتز نانوذرات اکسید روی به روش زیستی می‌توان از عصاره گیاهان و یا میکروب‌ها، استفاده نمود (شکل ۱-۲).



شکل ۱-۲: کاهنده‌های زیستی (Ahmad et al, 2017)

۴-۵-۱- سنتز زیستی نانوذرات اکسید روی با عصاره گیاهان

نانوذرات اکسیدروی را می‌توان با استفاده از بخش‌های مختلف گیاهان مانند برگ، ریشه، ریزوم، پوست درخت، میوه، گل و... سنتز کرد. در سال‌های اخیر، عصاره گیاهان مختلف در بیوسنتز فلزی و اکسید فلزی نانوذرات گوناگون مانند نانوذرات نقره، طلا، اکسید آهن، نانوذرات اکسیدروی، مس و... مورد بررسی قرار گرفته‌است (Rehana et al, 2017؛ Geetha et al, 2016؛ Bayrami et al, 2017). سنتز سبز این نانوذرات و مکانیزم آن‌ها وابسته به مواد شیمیایی گیاهی مانند آلکالوئیدها، فنل‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، تریپنوییدها، کربوهیدرات‌ها و غیره می‌باشد. بنابراین این ترکیبات گیاهی نقش مهمی در بیو سنتز نانو مواد با استفاده از عصاره‌های گیاهی، بازی می‌کنند (Ahmed et al, 2017).

۶-۱- گیاهان دارویی

گیاهان دارویی به گستره وسیعی از گیاهان اطلاق می‌شود که در درمان یا پیشگیری از بروز بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند. در تعریف دیگر، گیاه دارویی گیاهیست که دارای مواد مؤثره مشخصی است و در درمان بیماری بکار می‌رود و نام آن گیاه در یکی از فارماکوپه‌های معتبر بین‌المللی (Pharmacopoeia) از دو کلمه یونانی Pharmakon به

معنی دارو و Poies و به معنی ساختن تشکیل شده است) ذکر شده باشد (دوازده امامی، ۱۳۸۲). گیاه دارویی سه جنبه کاربردی دارد: طبی، ادویه‌ای، عطری و برخی در آن واحد دو یا سه جنبه را دارند (امیدبگی، ۱۳۸۴).

گیاهان دارویی، طب گیاهی و داروهای گیاهی از جمله‌ی مباحث بحث انگیز و پر اهمیت مربوط به علوم داروسازی و پزشکی در سال‌های گذشته بوده‌اند. مصرف گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی، سابقه‌ای دیرینه دارد. همواره انسان‌ها از گیاهانی که در طبیعت اطراف آن‌ها می‌رویده است، جهت کاربردهای غذایی، دارویی یا سایر مصارف روزمره زندگی استفاده می‌کردند (شمس اردکانی و همکاران، ۱۳۸۵). استفاده از گیاهان دارویی به قدمت عمر انسان است. امراض با پیدایش بشر متولد شده‌اند و اسناد چند هزار ساله موجود در تاریخ طب و داروسازی حاوی تجربیات و اطلاعات ارزشمند گیاه درمانی است (امین، ۱۳۸۵).

۱-۶-۱- تاریخچه گیاهان دارویی و کاربرد های آن ها

ارسطو (۳۳۰ سال قبل از میلاد) اولین کسی است که آثار و مطالبی مکتوب درخصوص شناخت گیاهان دارد. البته قبل از او در آثار کهن مصر (حدود ۲۶ قرن قبل از میلاد) در پاپيروس ها مطالبی از گیاهان با شرح خاصی از موارد استفاده از آنها باقیمانده است. ایرانیان از دیرباز و حتی پیش از دیگران در زمینه گیاهان دارویی و کاربرد درمانی آنها از دانش پیشرفته‌ای برخوردار بوده‌اند. نمونه بارز آن، کتاب باستانی اوستاست. به دلیل فراورده‌های طبیعی، عصاره و اسانس که از گیاهان دارویی به دست می‌آید ارزش ویژه‌ای دارند. مهمترین مواد موجود در عصاره و اسانس، آلکالوئیدها، تانین‌ها، فلاونوئیدها و یا ترکیبات فنلی می‌باشند. استخراج مواد موثره موجود در گیاهان، به وسیله حلال‌های مختلف انجام می‌پذیرد که از آن جمله می‌توان روش خیساندن، روش پرکولاسیون، روش هضم، روش دم کردن، روش جوشاندن و روش سوکسله می‌باشد. تاثیرات گیاهان دارویی و عصاره‌های حاصل از آنها در حیوانات نیز بررسی شده است که دارای اثراتی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد جمعیت‌های میکروبی، تأثیر بر سیستم ایمنی، عملکرد قابلیت هضم و تأثیر بر فاکتورهای خونی می‌باشد. اثرات سودمند این محصولات گیاهی در تغذیه حیوانات ممکن است ناشی از فعال سازی مصرف خوراک و ترشح غدد گوارشی، تحریک پاسخ‌های ایمنی بدن، اعمال فعالیت‌های ضد باکتریایی و ضد کوکسیدیوزی، فعالیت‌های ضد ویروسی، ضد التهابی و خصوصاً فعالیت به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های موثر

باشد(امیری فرد و همکاران، ۱۳۹۲).

۲-۶-۱- کاربرد گیاهان دارویی در ترمیم زخم

پوست بزرگترین و سنگین‌ترین عضو موجود در بدن انسان است که عملکردهای زیادی شامل تنظیم حرارت، هدایت حس‌های فیزیکی، سد مکانیکی، سنتز ویتامین D، و حفاظت در برابر اشعه ماوراء بنفش و عوامل فرسایشی و مهاجم را داراست. پوست از لحاظ ریخت‌شناسی و عملکردی از دو لایه تشکیل شده است که عبارتند از: روپوست یا اپی‌درم^۱ که لایه‌ی اپی‌تلیال با منشأ اکتودرم است که سلول‌های کراتینوسیت و سلول‌های اختصاصی مثل: لانگرهانس، ملانوسیت و مرکل، درون آن قرار گرفته است و ساختمانی واسط بین بیرون و داخل بدن فراهم کرده که مانع از دست رفتن رطوبت بدن می‌شود و فعالانه بدن را در مقابل خطرات محیطی مثل عفونت، مواد شیمیایی و اشعه‌ی فرابنفش حفظ می‌کند. دومین لایه پوست، میان‌پوست یا درم (Dermis) نام دارد که یک بافت همبند با منشأ مزودرمی غنی از کلاژن است که یکی از وظایف مهم آن، تغذیه روپوست می‌باشد؛ علاوه بر آن انعطاف پذیری، انسجام مکانیکی و نقش دفاعی را نیز بر عهده دارد (Malekmohammadi et al, 2011).

انسان از آغاز خلقت همیشه در معرض حوادث منجر به زخم بوده است. امروزه، زخم و ترمیم آن جایگاه ویژه و مهمی را به خود اختصاص داده‌اند. زخم را می‌توان گسیختگی نسجی دانست که به سبب عوامل مختلف، پیوستگی خود را از دست داده است و التیام زخم را می‌توان یک پاسخ دینامیکی به آسیب دانست که پیچیده و منظم است و مستلزم تعامل بین انواع مختلف سلول‌ها، فاکتورهای رشد، پروتئین‌های ساختمانی، و پروتئیناز می‌باشد (Alah Tavakoli et al, 2012).

در سال‌های اخیر تمایل زیادی به بررسی اثرات فیزیولوژی و فارماکولوژی عصاره‌های گیاهی و استفاده از داروهای گیاهی در جهان و به خصوص در ایران ایجاد شده است. عواملی همچون: عوارض جانبی کمتر، گوناگونی ترکیبات مؤثره موجود در گیاهان، هزینه‌های اقتصادی پایین‌تر، توسعه‌ی صنایع وابسته به کشت گیاهان دارویی، جلوگیری از خروج ارز از کشور، ایجاد کار مفید و به ویژه پیشنهاد استفاده از گیاهان دارویی توسط سازمان جهانی بهداشت، دلایل رویکرد جهانی به طب گیاهی است (Asadbegy et al,

(2011).

یکی از مشکلات بزرگی که طب جدید با وجود امتیازهای ظاهری، نسبت به طب سنتی - با خود به ارمغان آورده، مصرف روزافزون داروهای شیمیایی است. این مسئله با گذشت زمان شکل حادثری به خود می‌گیرد. امروزه باید متناسب با پیشرفت علم و تکنولوژی و استفاده از فناوری نانو، از گیاهان دارویی نیز بهره گرفت (Naghsh et al, 2013). استفاده از فرآورده‌های گیاهی در درمان انواع زخم‌ها از جمله بریدگی‌ها، سوختگی‌ها و غیره، در بسیاری از کشورها از جمله کشور ما، سابقه‌ی دیرینه دارد.

۷-۱- زخم (Wound)

زخم به معنای تخریب ساختمان آناتومیکی و عملکردی پوست است. از بین رفتن تمامیت پوست می‌تواند ضایعات و بیماری‌هایی را برای فرد ایجاد نماید که منجر به ناتوانی‌های اساسی و یا حتی مرگ او گردد. زخم ممکن است به روش‌های مختلف تقسیم‌بندی گردد؛ علت‌شناسی، محل آناتومیکی، حاد یا مزمن، وجود یا عدم وجود میکروارگانیسم در محل زخم، ظهور انواع بافت مشخص در بستر زخم و حتی عمق زخم می‌تواند ملاک انواع تقسیم‌بندی زخم قرار گیرد. زخم‌های عمومی به سه دسته شامل: زخم‌های سطحی (Superficial) همراه با از بین رفتن اپیدرم، زخم‌های نسبتاً عمیق (Partial thickness) شامل تخریب اپیدرم و درم و کاملاً عمقی (Fullthickness) شامل تخریب درم، چربی زیر پوست و بعضی مواقع استخوان تقسیم می‌گردند. تمام این تقسیم‌بندی، به منظور دستیابی به یک هدف مشخص مدیریت مناسب ترمیم زخم می‌باشد (Ghaderi et al, 2014).

آسیب دیدگی‌های سطحی شامل: خراش‌ها یا جراحات اپیدرم؛ یعنی، خارجی‌ترین لایه پوست هستند. این آسیب دیدگی‌ها می‌توانند به دلایل متفاوتی مانند: افتادن، جراحات حین ورزش، تصادفات جزئی، برخوردها، بریدگی‌های سطحی در حین کار در آشپزخانه یا باغ، سوختگی‌های جزئی و... رخ دهند. تمام آسیب دیدگی‌های سطحی و ساییدگی‌ها، در ابتدا با خونریزی اندکی شروع می‌شوند، اما روز به روز بهتر شده و ناپدید می‌شوند. اکثر اوقات، این آسیب دیدگی‌های سطحی، اسکار (جای زخم) بر جای نمی‌گذارند. اسکار تنها زمانی شکل می‌گیرد که لایه‌های عمقی پوست، آسیب ببینند و یا بسوزد و عمق زخم، از غشای پایه فراتر رود. از علل زخم‌های عمیق، می‌توان از حوادث رانندگی، نزاع و جنگ، قرارگرفتن در معرض گرما و یا سرمای بیش از حد، مشکلاتی در

Title and Author:	Study on effects of ZnO nanoparticles prepared by extract of <i>Alcea aucheri</i> on wound healing in rats Siavosh Tavagoli Kivi
Supervisor:	Dr.Abolfazl Bayrami, Dr.Saber Zahri
Graduation date:	2019/6/2
Number of pages:	98

Abstract

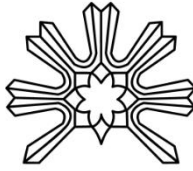
Research Aim: Considering the positive effects of medicinal plants on controlling and treating diseases as well as the advancement of new sciences such as nanotechnology, it is possible to combine traditional science with new effective ways to control and treat diseases. In this study, the goal of helping treatment The wound is made using zinc oxide nanoparticles prepared with an extract of the plant. Hemmatium is a plant that reduces inflammation and antioxidants. Zinc oxide nanoparticles have antibacterial, anti-inflammatory and antiseptic properties that are widely used in the production of skin creams.

Research method: In this study, the aqueous extract of the plant (*Alcea aucheri*) was prepared. Zinc oxide nanoparticles were synthesized and prepared for use as an aqueous extract, and their effects on wound healing induced in mice were studied. Structural properties of nanoparticles were evaluated using XRD, TGA, UV-vis DRS, FT-IR, BET, and SEM analyzes. 4 Wistar rats group (n = 5 in each group) were treated. After wounding in the skin of mice, they were exposed to the extract and prepared nanoparticles for 18 days. Every three days the wound dressing was changed and imaged. Progressive changes in the wound area were recorded every six days and for 18 days .At the end of the 6th, 12th and 18th days, the wound specimen was sampled and subjected to Hematoxylin- Eosin and Mason staining.

Findings: The size of the oxidation nanoparticles synthesized by the biological method was 17.7 nm, which showed a decrease in size relative to the oxidation nanoparticles synthesized by the chemical method (19 nm). Also, TGA, UV-vis DRS and FT-IR techniques confirmed the presence of plant extracts molecules with zinc oxide. The results showed a significant decrease in the size of the wound in the mice treated with the extract of the alumina extract than the control group.

Conclusion: According to the results, we can conclude that the combination of traditional and new science meaningful impact seems to make a great difference in accelerating wound healing.

Keywords: Zinc oxide nanoparticles - *Alcea aucheri*- Wound healing- Green synthesis.



University of Mohaghegh Ardabili
Faculty of Science
Department of Biology

Dissertation submitted in partial fulfillment for the degree of
M.Sc. /M.A
in
Animal Biology

Study on effects of ZnO nanoparticles prepared by
extract of *Alcea aucheri* on wound healing in rats

By:
Siavosh Tavagoli Kivi

Supervisor:
Dr.Abofazel Bayrami, Dr.Saber Zahri

Advisor:
Dr. Shima Rahimpouran/ Farid Mohammadi Arvanagh

June 2019