دانشگاه علوم **پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ادبیل**

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت اخذ دکترای عمومی داروسازی

عنوان

سنتز و مشخصه یابی نانوذرات مگنتیک فلورسنت متصل به آنتی بادی ضد HER2

استاد راهنما:

دکتر محمد جوهری اهر

پژوهشگر:

میثم ندیری

بهار ۱۳۹۹

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به پدرم که مهر آسمانی اش آرام بخش آلام زمینی ام است
به استوارترین تکیه گاهم،دستان پرمهر برادرم و خواهرانم
به سبزترین نگاه زندگیم،چشمان سبز مادرم
که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره ای از دریای بی کران مهربانیتان را سپاس نتوانم بگویم.
امروز هستی ام به امید شماست و فردا کلید باغ بهشتم رضای شما
را آوردی گران سنگ تر از این ارزان نداشتم تا به خاک پایتان نثار کنم،باشد که حاصل تلاشم نسیم گونه غبار خستگیتان را بزداید.
بوسه بر دستان پرمهرتان...

از استاد گرامیم
جناب آقای دکتر محمد جوهری
بسیار سپاسگذارم چرا که بدون راهنماییهای ایشان انجام این پایان نامه بسیار مشکل مینمود.

با تشکر از استاد گرانقدر،
جناب آقای دکترپیری
در طول دوره تحصیل همواره با سعه صدر و دلسوزی راهگشای من بود و همیشه از راهنمایی های ارزشمند و خردمندانه ایشان بهره بردم.

چکیده

مقدمه

در طول پروسه سرطانی شدن سلول های انسانی تغییرات مختلف مورفولوژیکی و ژنتیکی در سلول اتفاق می افتد و ممکن است پروتئین های خاصی در قسمت های مختلف سلول بیان بیشتری داشته باشند. سطح خارجی غشا سلول محل بیان پروتئین هایی است که به دلیل امکان دسترسی آزاد آنتی بادی ها از اهمیت خاصی برخوردار است و این مواد زیستی به عنوان بیومارکر مطرح هستند. یک آنتی بادی به راحتی می تواند بیومارکر مخصوص به خود را تشخیص دهد ولی نمی تواند به خودی خود سیگنالی (الکتریکی، شیمیایی، الکتروشیمیایی، نوری، گرمایی و ...) برای ردیابی و اندازه گیری تولید کند. با اتصال یک آنتی بادی با مواد تولید کننده سیگنال مانند نانوذرات مغناطیسی و کوانتوم دات که پایداری مناسب داشته و با یک تحریک خارجی سیگنال پایدار تولید کند می توان به یک پروب تشخیصی مطمئن دست یافت.

مواد و روش ها

در این پروژه، ابتدا نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن به روش ترسیب در محیط قلیایی سنتز و اطراف آن با یک لایه نازک سیلیکاتی حاوی نانوذرات کوانتوم دات پوشش داده شد. این پوشش امکان متصل کردن بیومولکول ها بخصوص آنتی بادی مونوکلونال تراستوزومب را فراهم نمود. این نانوذرات طوری طراحی شده اند که در حضور آنتی ژن HER2 توانایی اتصال به این بیومارکر را داشته و به دنبال اتصال خصوصیات نوری و مغناطیسی نانوذرات امکان شناسایی این نانوذرات را فراهم می کند.

نتایج

پس از تهیه نانوذرات مگنتیک فلورسنت متصل به آنتی بادی تراستوزومب سایز، خصوصیات سطح ذره و طیف های جذب و نشری و قدرت مغناطیسی آنها مورد مطالعه و در نهایت قدرت اتصال و سیگنال دهی آنها در حضور آنتی ژن مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه گیری

مطالعات به ما نشان داد نانوذرات مگنتیک فلورسنت متصل به آنتی بادی مونوکونال تراستوزومب توانایی اتصال به آنتی

ژن HER2 را دارد.این مطالعات در حضور سرم حاوی HER2در آزمایشگاه بررسی شد که نتایج حاصل از این اتصال در زیر نور UV مشخص گردید.

واژه های کلیدی: بیومارکر، مونوکلونال آنتی بادی، نانوذرات کوانتوم دات ، آنتی ژن HER2، تراستوزومب

فهرست مطالب

فصل ۱: مقدمه ۲

۱-۱- سرطان: ۳

۱-۱-۱- انواع سرطان ۴

۱-۱-۲- عوامل ایجاد سرطان ۴

۱-۱-۳- اپیدمیولوژی سرطان ۵

۱-۱-۴- سرطان پستان ۷

۱-۱-۵- درمان سرطان سینه ۸

۱-۲- آنتی ژن HER2 ..... ۹

۱-۳- راستوزومب ۱۱

۱-۴- نانوفناوری ۱۳

۱-۵- فناوری نانو ۱۴

۱-۵-۱- گرانش و فناوری نانو ۱۵

۱-۵-۲- مووینگی و فناوری نانو ۱۵

۱-۵-۳- مواد نانو ساختار ۱۶

۱-۵-۴- نانو ذرات ۱۶

۱-۶- نانوذرات نیمه رسانا (نقاط کوانتمی) ۱۷

۱-۷- کوانتوم دات پایه کربن(CQD) ۱۸

۱-۸- پدیده فلورسانس ۲۴

۱-۹- نانو ذرات هسته-پوسته ۲۵

۱-۱۰- نانوذرات مغناطیسی ۲۶

۱-۱۰-۲- ذرات مغناطیسی در مصارف پزشکی به دو شکل اصلی موجود هستند : ۲۹

۱-۱۰-۲-۱- ساختار پوسته- هسته (core-shell): ۲۹

۱-۱۰-۲-۲- ذرات جایگذاری شده در پلیمر متخلخل: ۳۰

۱-۱۱- هدف کلی: ۳۰
۱-۱۱-۱- اهداف اختصاصی: ۳۰
۱-۱۱-۲- اهداف کاربردی: ۳۱
۱-۱۱-۳- فرضیات یا سؤالات تحقیق: ۳۱
فصل ۲: مواد و روش‌ها ۳۲
۲-۱- معرف‌ها و مواد شیمیایی: ۳۳
۲-۲- دستگاهها ۳۳
۲-۳- روش کار کلی پروژه ۳۴
۲-۴- سنتز کوانتوم دات کربن (CQD) ۳۵
۲-۵- سنتز نانوذارت مگنتیت (Fe3O4) ۳۶
۲-۶- سنتز پوسته-هسته Fe3O4@CQD ۳۷
۲-۷- اتصال آنتی بادی به هسته-پوسته Fe3O4@SiO2@CQD ۳۸
۲-۸- بررسی پراکندگی نوری دینامیکی (DLS) ۳۹
۲-۹- ملاحظات اخلاقی ۴۰
فصل ۳: نتایج ۴۱
۳-۱- ریخت شناسی و بررسی اندازه و شکل نانوذرات و بیوسنسور طراحی شده توسط TEM و DLS ۴۲
۳-۲- مشخصه یابی نانوذرات و بیسنسور طراحی شده توسط اسپکتروسکوپی UV-Vis ۴۷
۳-۳- مشخصه یابی نانوذرات و بیسنسور طراحی شده توسط اسپکتروسکوپی فلورسانس ۵۱
فصل ۴: بحث و نتیجه گیری ۵۵
۴-۱- بحث ۵۶
۴-۲- نتیجه گیری ۵۷
۴-۳- پیشنهادات: ۵۸
منابع: ۵۹

فهرست جداول

جدول ۲-۱ مشخصات مواد شیمیایی به کار رفته ۳۳

جدول ۲-۲ مشخصات دستگاه ها و وسایل آزمایشگاهی به کار رفته. ۳۴

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱ : پیش بینی مبتلایان ناشی از سرطان در سال ۲۰۲۰ ..... ۶

شکل ۱-۲ : پیش بینی مرگ ناشی از سرطان در سال ۲۰۲۰ ..... ۷

شکل ۱-۳ انواع جراحی برداشتن سینه در زنان مبتلا به سرطان سینه ۹

شکل ۱-۴ مراحل مختلف سرطان سینه متاستاتیک ۱۱

شکل ۱-۵ افزایش بیان غیر طبیعی ژن HER2 منجر به افزایش گیرنده پروتئینی HER2 در سطح سلولهای تومورال می شود. ۱۲

شکل ۱-۶ مکانیسم عملکرد تراستوزومب ۱۳

شکل ۱-۷ اندازه نسبی نانوذرات در مقایسه با مولکولهای مشابه ۱۴

شکل ۱-۸ اشکال مختلف نانوذرات. ۱۷

شکل ۱-۹ (A) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری و (B) نشر فلورسانس نقاط کوانتومیCdSe ۱۸

شکل ۱-۱۰ انواع کربن کوانتوم دات (CQD) ۱۹

شکل ۱-۱۱ دو روش مهم سنتز CQD: برش "از بالا به پایین" منابع مختلف کربنی و سنتز از "پایین به بالا" توسط مولکولهای آلی یا پلیمرها ۲۰

شکل ۱-۱۲ (a) GQD ناهمسانگرد با ساختار کربن تک لایه، با ارتفاع کمتر از ۱ نانومتر و فاصله شبکه ای ۰/۲۴ نانومتر است. (b) تصاویر HRTE. (c) ساختار پایدار ممکن برای هر یک ساختار مولکولی GQD مطابق با الگوی جرمی مشاهده شده در اسپکتروسکوپی جرمی MALDI-TOF. ۲۲

شکل ۱-۱۳ اثر اندازه نقاط کوانتومی کربن (CQD). a) تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از CQD با تحریک ۲۳

شکل ۱-۱۴ مکانیسم فرآیند فلورسانس ۲۵

شکل ۱-۱۵A) نانو ذرات هسته-پوسته طلا که بر روی هستههای کروی یک نافلز ساخته شدهاند، B) تصاویر TEM هستههای نافلزی قبل (سمت چپ تصویر) و بعد (سمت راست تصویر) از نشانش طلا بر روی آنها. C) با تغییر سایز پوسته در این نانوذرات بنابراین رنگهای متفاوتی قابل حصول هستند. ۲۵

شکل ۱-۱۶ کاربردهای نانو ذرات مغناطیسی در زیست-پزشکی ۲۷

شکل ۱-۱۷ اثر میدان خارجی بر ذرات مغناطیسی ۲۸

شکل ۱-۱۸ انواع ساختارهای نانوذرات مغناطیسی: A و B) کپسوله شده در پوشش پلیمری. C) کپسوله شده لیپوزومی. B) ساختار پوسته – هسته. ۲۹

شکل ۱-۱۹ نمونه core-shell از هسته فلزی که با سیلیکا یا پلیمرهایی مثل PVA ویا دکستران پوشیده شده اند. ۳۰

شکل ۲-۱ ساختار شیمیایی معرف‌های EDC و NHS و نحوه فعال شدن گروه کربوکسیلیکی توسط این معرف‌ها برای اتصال آن به گروه آمینی ۳۵

شکل ۲-۲ مراحل ساخت و عملکرد Ab-Fe3O4@CQD ۳۵

شکل ۲-۳ روش سنتز نانوذرات مغناطیسی ۳۷

شکل ۲-۴ شکل سنتز هسته/پوسته Fe3O4@SiO2@CQD ۳۸

شکل ۳-۱ آنالیز تفرق دینامیکی نور (DLS) برای CQD ۴۳

شکل ۳-۲ آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) برای کربن کوانتوم دات ۴۳

شکل ۳-۳ آنالیز تفرق دینامیکی نور (DLS) برای Fe3O4. ..... ۴۴

شکل ۳-۴ آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) برای Fe3O4. ..... ۴۴

شکل ۳-۵ آنالیز تفرق دینامیکی نور (DLS) برای Fe3O4@CQD ۴۵

شکل ۳-۶ آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) برای Fe3O4@CQD. ۴۵

شکل ۳-۷ آنالیز تفرق دینامیکی نور (DLS) برای Ab-Fe3O4@CQD. ۴۶

شکل ۳-۸ آنالیز تفرق دینامیکی نور (DLS) برای HER2-Ab-Fe3O4@CQD. ۴۶

شکل ۳-۹ آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) برای HER2-Ab-Fe3O4@CQD ۴۷

شکل ۳-۱۰ طیف جذبی UV-Vis برای Fe3O4 (a)، Ab-Fe3O4 (b) و HER2-Ab-Fe3O4 (c) ۴۸

شکل ۳-۱۱ محلول Fe3O4 قبل (A) و بعد (B) از اعمال میدان مغناطیسی خارجی ۴۹

شکل ۳-۱۲ طیف جذبی UV-Vis برای Fe3O4 (a)، Ab-Fe3O4 (b) و HER2-Ab-Fe3O4 (c) ۵۰

شکل ۳-۱۳ محلولهای CQD (A)، Fe3O4@CQD (B) و Ab-Fe3O4@CQD قبل (C) و بعد (D) از اعمال میدان مغناطیسی خارجی ۵۱

شکل ۳-۱۴ طیف فلورسانس Fe3O4 (a)، CQD (b)، Fe3O4@CQD (c)، Ab-Fe3O4@CQD (d) و HER2-Ab-Fe3O4@CQD (e) ۵۳

شکل ۳-۱۵ شکل محلولهای Fe3O4 (A)، CQD (B)، Fe3O4@CQD (C)، Ab-Fe3O4@CQ (D) و HER2-Ab-Fe3O4@CQD قبل (E) و بعد (F) از اعمال میدان مغناطیسی خارجی در زیر لامپ UV با طول موج ۳۶۵ nm ۵۴

فهرست اختصارات

Abbreviation	Text
DLS	**Dynamic light scattering**
CQD	**Carbon Quantum dots**
TEM	**Transmission electron microscopy**
HNPCC	**Hereditary nonpolyposis colorectal cancer**
NMR	**Nuclear magnetic resonance**
mg	**Miligram**
ml	**Mililiter**
nm	**Nanometer**
GQD	**Graphene quantum dot**
MNP	**Magnetic nanoparticles**
WHO	**World Health Organization**
XRD	**X-ray diffraction**
XPS	**X-ray photoelectron spectroscopy**
MRI	**Magnetic resonance imaging**
PVA	**Polyvinyl alcohol**
Rpm	**Round per minutes**
UV	**Ultra violat**