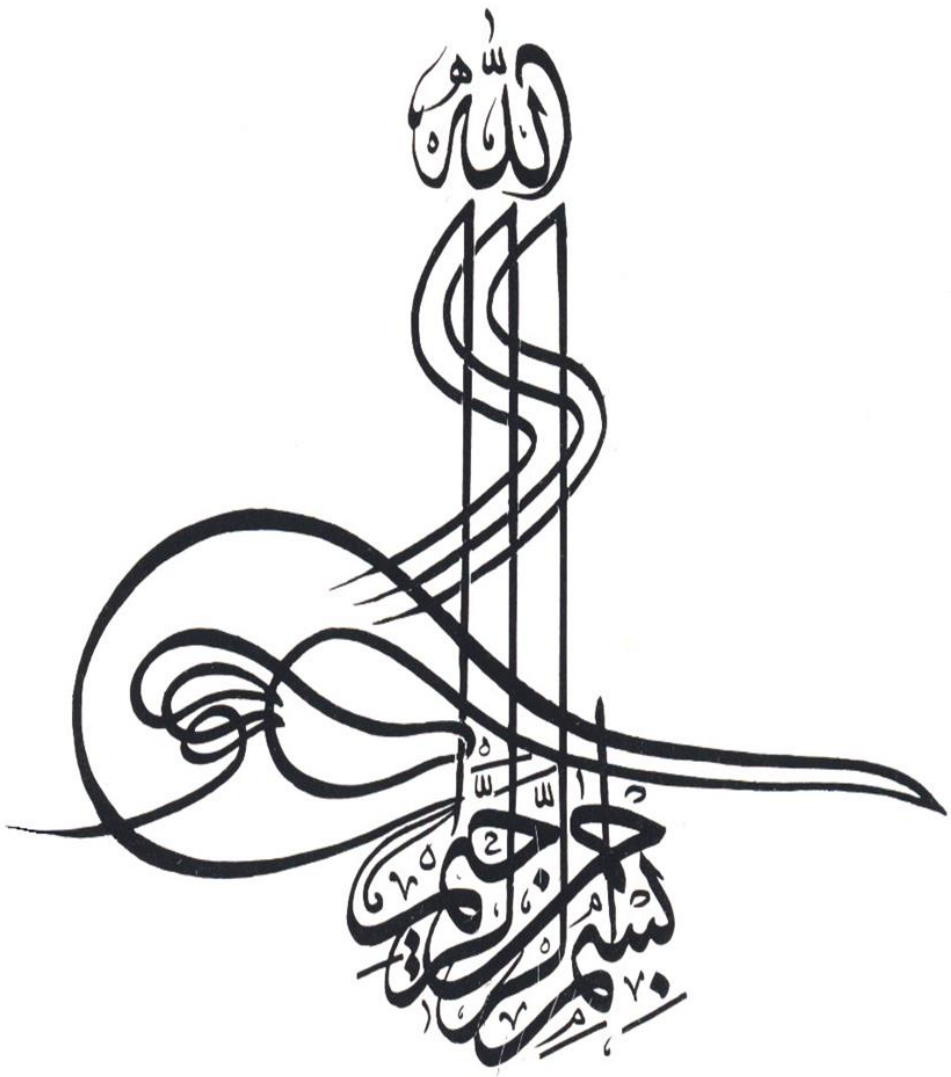
الله
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه رساله ی دکترای حرفه ای داروسازی

عنوان:

بررسی برهمکنش داروی اینترکالیتور میتوکسانترون با DNA و محاسبه ثابت های اتصال با استفاده از تکنیک رزونانس پلاسمون سطحی و روش اسپکتروسکوپی

اساتید راهنما:

دکتر محمد جوهری اهر

دکتر فرزانه فتحی

نگارش:

مهدی عبدیان

شماره پایان نامه:

د-۱۰۱-۱۴۰۰/۹

آذر ماه ۱۴۰۰

تقدیم به

محکم ترین و استوارترین پشتوانه زندگیم

تقدیم به عشق و ایثار ، گذشت و بزرگواری و قلب پر از مهر و عطوفت

"پدرم "

به پاس لحظه لحظه آسایش و آرامش زندگی ام.

تقدیم به

عشق و مهربانی ،دلسوزی و محبت ، روح زندگی ام

همراه همیشگی لحظات سخت زندگی ام تقدیم به

" مادرم "

به پاس تمام زحمات و شب زنده داریهایش.

تقدیم به

اساتید عالیقدرم

"دکتر محمد جوهری"

"دکتر فرزانه فتحی"

که بزرگواری ، پشتکار و صبر را به من آموختند.

تشکر و قدردانی

سپاس بیکران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

تشکر قلبی و لسانی خود را از استاد عالی قدر جناب آقای دکتر محمد جوهری و سرکار خانم دکتر فرزانه فتحی که زحمت راهنمایی این پایان نامه را عهده دار گردیدند و در تمامی مراحل انجام رساله از راهنمایی های مدبّرانه ایشان استفاده نمودم ابراز می دارم و توفیقات روز افزون ایشان را توأم با صحت و سعادت خواستارم.

چکیده

مقدمه: یکی از مکانیسم های مهم داروهای ضدسرطان مانند میتوکسانترون اتصال به DNA و مختل کردن تکثیر آن می‌باشد. در این میان، یکی از تکنیک های قدرتمند برای مطالعات کینتیک اتصال دارو و DNA استفاده از روش پلاسمون رزونانس سطحی است که اطلاعات بسیار مفیدی در مورد ثابت های اتصال و تفکیک دارو-DNA بدست می‌دهد. از این رو محاسبه دقیق پارامترهای کنیتیکی اتصال دارو ها با DNA بسیار ارزشمند است. یکی از داروهای ضد سرطان که محاسبه دقیق ثابت های اتصال می‌تواند کمک شایانی به مطالعات بالینی کند میتوکسانترون است که به صورت مستقیم با DNA اتصال برقرار می‌کند. رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) یک پدیده نوری است که برای مشاهده زنده برهم کنش بین یک آنالیت و بیومولکول تثبیت شده بر سطح بسیار کارا می‌باشد. زاویه پلاسمون سطح به تغییر ضریب دی الکتریک پس از اتصال آنالیت حساس است. روش های اسپکتروسکوپی بخصوص فلورسانس مولکولی نیز می تواند به دلیل تغییر در شدت یا طول موج نشری پس از اتصال دارو به DNA به عنوان تکنیک مهمی در محاسبات ثابت اتصال و تفکیک بکار رود البته مطالعه real-time با این تکنیک مانند SPR بسیار مشکل است.

روش کار: به منظور فراهم کردن گروه های کربوکسیلیک روی سطح تراشه طلا، محلول مرکاپتوآندکانوئیک اسید (MUA) استفاده شد که باعث می‌شود MUA از طرف تیول خود به سطح طلا متصل گردد. سپس برای فعال سازی گروه های کربوکسیلیک، محلول اِن هیدروکسی سوکسینیمید (NHS) و ۱ اتیل– ۳ – (۳–دی متیل آمینوپروپیل)کربودی ایمید(EDC) استفاده شد. در ادامه، DNA آمینه (دارای انتهای آمینی) تزریق گردید تا بر روی سطح چیپ طلا از طریق تشکیل پیوند آمیدی متصل شود. غلظتهای مختلف از داروی میتوکسانترون در سه دمای مختلف جهت بدست آوردن ثابت های اتصال تزریق گردید.

یافته ها: ثابت اتصال محاسبه شده از SPR و طیف سنجی فلورسانس نشان داد که در دمای ۳۱ درجه سانتی گراد، MTX میل بالاتری برای اتصال به DNA دارد.

نتیجه گیری: تجزیه و تحلیل داده های ترمودینامیکی نشان داد که پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش-های وان‌دروالسی نقش مهمی در شکل گیری کمپلکس MTX:DNA دارند.

کلید واژه ها: بیوسنسور نوری، SPR، DNA، میتوکسانترون، فلورسانس.

فهرست مطالب

چکیده ..... أ
فهرست مطالب ..... ب
فهرست اشکال ..... ث
فهرست جداول ..... ح
فهرست اختصارات ..... خ
۱ -مقدمه ۲
۱ - ۱ -میتوکسانترون ۳
۱ - ۲ -بیوسنسورها ۵
۱-۳-بیورسپتور های مورد استفاده در بیوسنسور ها ۷
۱ - ۳ - ۱ -بیوکاتالینتیک (آنزیم ها) ۷
۱-۳-۲-ایمونولوژیک (آنتی بادی ها) ۸
۱-۳-۳-گیرنده ها ۸
۱-۳-۴-اسیدهای نوکلئیک ۸
۱ - ۴ -طبقه بندی بیوسنسورها ۹
۱-۴-۱-مبدل های الکتروشیمیایی ۹
۱-۴-۲-مبدل های پیزوالکتریک ۹
۱-۴-۳-مبدل های گرمایی یا گرماسنجی ۱۰
۱-۴-۴-مبدل های نوری ۱۰
۱ - ۵ -پلاسمون ۱۲
۱ - ۶ -پلاسمون سطحی ۱۲
۱ - ۷ -رزونانس پلاسمون سطحی ۱۴
۱ - ۸ -بیوسنسورهای بر پایه رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) ۱۵
۱-۹-اجزای تشکیل دهنده بیوسنسورهای بر پایه SPR ۱۶
۱-۹-۱-تراشه طلا ۱۷
۱-۹-۲-روش های تثبیت لیگند در سطح تراشه ۱۸
۱ - ۹ - ۳ -آنالیز منحنی پاسخ SPR (سنسوگرام) ۲۰
۱ - ۹ - ۴ -بازیابی تراشه های SPR ۲۲
۱-۱۰-چشم انداز بیوسنسورهای بر پایه SPR ۲۳
۱ - ۱۱ -روش های طیف سنجی ۲۴
۱ - ۱۱ - ۱ -طیف سنجی UV-Vis ۲۵

۱ - ۱۱ - ۲ -طیف سنجی فلوئوروسانس ۲۶
۱ - ۱۲ -خاصیت فلورسانس میتوکسانترون (MTX)..... ۲۷
۱ - ۱۳ -هدف از تحقیق حاضر ۲۸
۲ -فصل دوم: مواد، دستگاهها و روش‌ها ۳۰
۲ - ۱ -معرف ها و مواد شیمیایی ۳۰
۲ - ۲ -دستگاههای مورد استفاده..... ۳۰
۲ - ۳ -تهیه محلول ها و بافر ۳۱
۲ - ۳ - ۱ -تهیه بافر فسفات (PBS) ۳۱
۲ - ۳ - ۲ -تهیه محلول MTX..... ۳۲
۲ - ۳ - ۳ -تهیه محلول DNA..... ۳۲
۲-۴-بررسی نحوه برهمکنش MTX با DNA..... ۳۳
۲ - ۴ - ۱ -مطالعات طیف سنجی فلورسانس ۳۳
۲ - ۴ - ۲ -مطالعات رزونانس پلاسمون سطحی (SPR) ۳۵
۲ - ۵ -معتبر سازی آزمایشات ۳۷
۲ - ۶ -نرم افزارهای استفاده شده در کار پژوهشی حاضر ۳۷
۲ - ۷ -ملاحظات اخلاقی ۳۸
۳ -نتایج و بحث..... ۴۰
۳-۱-مشخصه یابی برهمکنش MTX و DNA توسط طیف سنجی فلورسانس..... ۴۰
۳ - ۱ - ۱ -تعیین ثابت خاموش سازی استرن-ولمر با استفاده از طیف فلورسانس ۴۳
۳ - ۱ - ۲ -تعیین ثابت اتصال ظاهری با استفاده از طیف فلورسانس ۴۵
۳ - ۲ -طراحی بیوسنسور نوری بر پایه توسط SPR..... ۴۷
۳ - ۲ - ۱ -مشخصه یابی مراحل ساخت بیوسنسور توسط SPR..... ۴۸
۳ - ۲ - ۲ -بررسی سینتیک برهمکنش MTX با DNA توسط SPR ۵۰
۳ - ۲ - ۳ -مطالعه ترمودینامیک برهمکنش MTX با DNA توسط SPR..... ۵۲
۴ -نتیجه گیری و پیشنهادات..... ۵۵
۴ - ۱ -نتیجه گیری ۵۶
۴ - ۲ -پیشنهادات..... ۵۶
ABSTRACT I

فهرست اشکال

شکل ۱-۱: (A) اشکل دارویی و (B) ساختار شیمیایی میتوکسانترون. ۴
شکل ۱-۲: (A) تصویر شماتیک اتصال میتوکسانترون فعال شده با فرمالدئید و DNA. اتصال کووالانسی از طریق متیلن بین یک رشته DNA و میتوکسانترون (رشته "C") و پیوند هیدروژنی (نشان داده شده بوسیله خطوط خط چین) بین رشته غیر متصل و دارو ("رشته N") تثبیت می شود. واحد متیلن توسط فرمالدئید تأمین می شود. (B) این مدل میتوکسانترون محدود شده در شیار کوچک DNA و اتصالات مربوط به آنها را به تصویر می کشد. اتصال کوالانسی توسط یک اتم کربن مشتق شده از فرمالدئید تامین می شود [۴]. ۴
شکل ۱-۳: تصویر شماتیک از عملکرد یک بیوسنسور [۹]. ۶
شکل ۱-۴: شماتیکی از یک بیوسنسور نوری [۲۵]. ۱۱
شکل ۱-۵: تصویر نمایش شماتیک یک موج چگالی الکترون که در امتداد یک رابط فلز-دی الکتریک منتشر می شود. نوسانات چگالی بار و میدانهای الکترومغناطیسی مرتبط را موجهای سطح پلاسمون-پلاریتون می نامند. وابستگی نمایی شدت میدان الکترومغناطیسی به فاصله دور از رابط در سمت راست نشان داده شده است. این امواج را می توان بسیار کارآمد با نور در محدوده مرئی طیف الکترومغناطیسی تحریک کرد [۲۷]. ۱۳
شکل ۱-۶: شماتیکی از اصول اندازه گیری SPR ۱۶
شکل ۱-۷: اشکال مختلف تراشه طلا در SPR ۱۸
شکل ۱-۸: انواع تراشه های طلای اصلاح شده تجاری شرکت BIACORE [۳۳]. لایه طلا با ضخامت ۵۰ نانومتر به رنگ زرد، زنجیرهای اشباع از آلکیل تیول با ضخامت های مختلف به رنگ آبی، گروه های کربوکسیلیک به صورت نقاطی به رنگ قرمز، زنجیره های دکستران با طول های مختلف به رنگ سبز، گروه های لیپوفیلیک به رنگ سیاه و گروه های نیتریلو تری استیک اسید به صورت نقاطی به رنگ آبی نشان داده شده است. ۲۰
شکل ۱-۹: منحنی سنسوگرام SPR [۳۴]. ۲۱
شکل ۱-۱۰: معادلات فازهای سنسوگرام در مدل لانگمویر[۳۵] ۲۲
شکل ۱-۱۱: انواع محلولهای بازیابی سطح تراشه SPR [۳۶] ۲۳
شکل ۱-۱۲: بیوسنور طراحی شده برپایه SPR برای مطالعه برهمکنش بین MTX و DNA ۲۸
شکل ۳-۱: تغییرات نشر فلورسانس در طول موج ۶۹۰ برای حجم های مختلف MTX در حضور حجم ثابت ۲۵ میکرولیتر DNA با طول موج های تحریکی ۵۹۰، ۵۹۵، ۶۰۰، ۶۰۵ و ۶۱۰ نانومتر و در دماهای (A) ۲۵، (B) ۳۱ و (C) ۳۷ درجه سانتی گراد. ۴۱
شکل ۳-۲: تغییرات نشر فلورسانس در طول موج ۶۹۰ برای ۲۵ میکرولیتر MTX در حضور حجم های مختلف DNA با طول موج های تحریکی ۵۹۰، ۵۹۵، ۶۰۰، ۶۰۵ و ۶۱۰ نانومتر و در دماهای (A) ۲۵، (B) ۳۱ و (C) ۳۷ درجه سانتی گراد. ۴۲
شکل ۳-۳: نمودار خطی استرن ولمر برای خاموشی فلورسانس MTX طی برهمکنش با DNA در دماهای (A) ۲۵، (B) ۳۱ و (C) ۳۷ درجه سانتی گراد. ۴۴
شکل ۳-۴: نمودار خطی HU ET AL برای خاموشی فلورسانس MTX طی برهمکنش با DNA در دماهای (A) ۲۵، (B) ۳۱ و (C) ۳۷ درجه سانتی گراد. ۴۶
شکل ۳-۵: مراحل ساخت بیوسنسور SPR و نحوه عملکرد آن. ۴۸
شکل ۳-۶: سنسوگرام مراحل تثبیت DNA بر روی تراشه. (A) کانال آزمایش و (B) کانال مرجع. ۴۹
شکل ۳-۷: شیف زاویه SPR برای (A) تراشه طلا برهنه، (B) بعد از اصلاح با MUA و (C) بعد از تثبیت DNA. ۵۰

شکل ۳-۸: سنسوگرام سنتیکی اثر برهمکنش MTX و DNA برای غلظت های مختلف از MTX (۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار) (سرعت جریان: ۲۰ میکرولیتر در دقیقه، زمان تزریق: ۲۰ دقیقه و دماهای(A) ۲۵، (B) ۳۱ و (C) ۳۷ درجه سانتی گراد). ۵۲
شکل ۳-۹: نمودار خطی VAN'T HOFF برای مطالعه برهمکنش ترمودینامیکی MTX و DNA. ۵۴

فهرست جداول

جدول ۲-۱ مشخصات مواد شیمیایی مورد استفاده ۳۰
جدول ۳-۱ پارامترهای سنتیکی برهمکنش MTX و DNA بر اساس مطالعات فلورسانس ۴۷
جدول ۳-۲ پارامترهای سینتیکی و ترمودینامیکی کمپلکس DNA / MTX ۵۱

فهرست اختصارات

نام اختصار	معادل انگلیسی	معادل فارسی
DNA	Deoxyribonucleic acid	دئوکسی ریبونوکلئوتید اسید
k_a	Association rate constant	ثابت سرعت اتصال
K_b	Binding constant	ثابت اتصال ظاهری
k_d	Dissociation rate constant	ثابت سرعت تفکیک
K_D	Dissociation constant	ثابت تفکیک
K_{sv}	Stern–Volmer quenching constant	ثابت خاموش سازی استرن–ولمر
K_q	Quenching constant	ثابت سرعت خاموش سازی
MCH	Mercaptohexanol	مرکاپتو هگزانول
MTX	Mitoxantrone	میتوکسانترون
MUA	11-Mercaptoundecanoic acid	۱۱–مرکاپتوندکائونیک اسید
SPR	Surface Plasmon Resonance	رزونانس پلاسمون سطحی
τ_0	Fluorescence life time	طول عمر فلورسانس