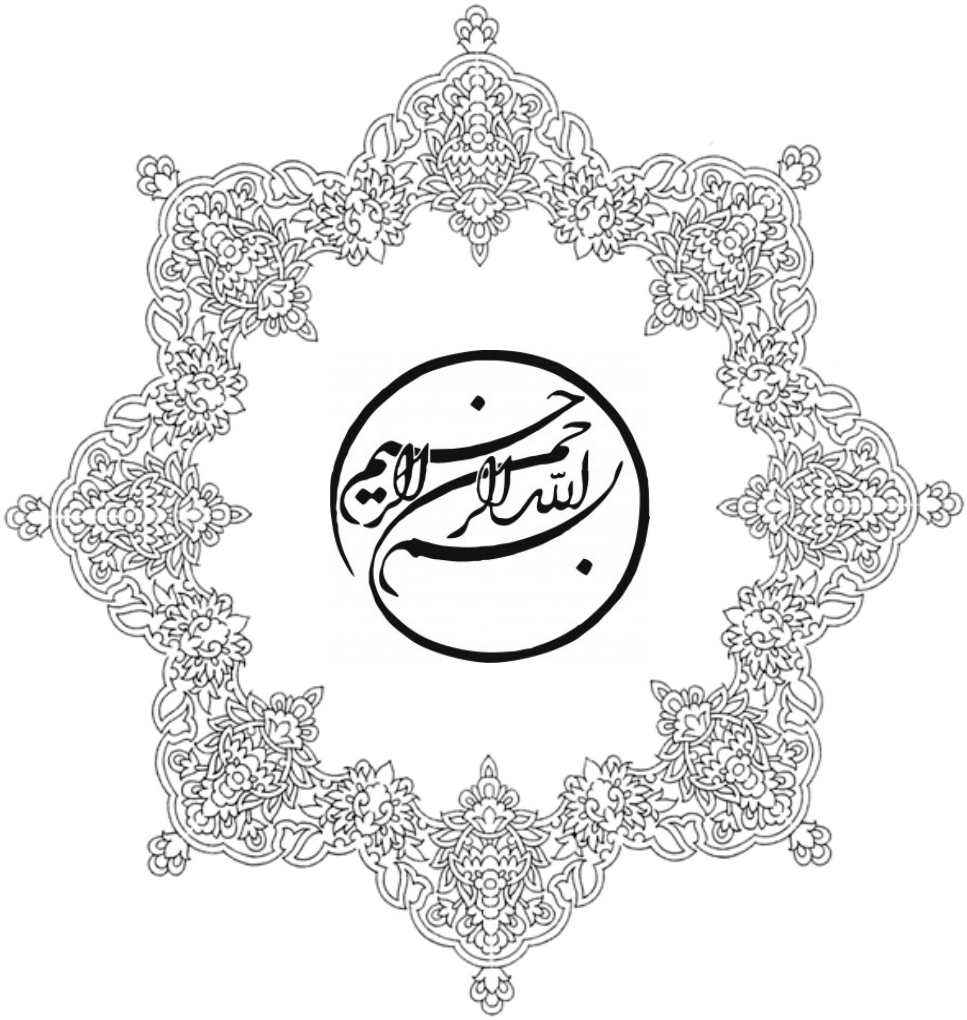

بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم زهرا نصرالهی رشته **قارچ شناسی پزشکی** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **بررسی اثر ایمنومدولاتوری و ضدتوموری حامل نانوبتا ۳-۱ گلوکان کاندیدا آلبیکنس در سرطان پستان Her2+** » در تاریخ **۱۳۹۲/۹/۳۰** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنمای اصلی	دکتر شهلا رودبار محمدی	
استاد راهنمای دوم	دکتر فاطمه اطیابی	
استاد مشاور	دکتر زهیر صراف	
استاد مشاور	دکتر محمد حسین یادگاری	
استاد ناظر	دکتر فاطمه غفاری فر	
استاد ناظر	دکتر پروین منصوری	
استاد ناظر	دکتر زهره شریفی	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر معصومه شمس	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **زهرا نصرالهی** دانشجوی رشته **قارچ شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۸** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا
تاریخ

زهرا نصرالهی ۱۳۹۲/۱۰/۰۷

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (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 می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **قارچ شناسی پزشکی** است که در سال **۱۳۹۲** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **خانم دکتر شهلا رودبار محمدی و خانم دکتر فاطمه اطیابی** ، مشاوره **آقای دکتر زهیرصراف و آقای دکتر محمد حسین یادگاری** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد 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 به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **زهرا نصرالهی** دانشجوی رشته **قارچ شناسی پزشکی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

زهرا نصرالهی

تاریخ و امضا ۱۳۹۲/۱۰/۰۷

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته قارچ شناسی پزشکی

عنوان

بررسی اثر ایمونومدولاتوری و ضد توموری حامل نانو بتا ۱-۳ گلوکانِ کاندیدا آلبیکنس درسرطان پستان HER2+

نگــارش

زهـــرا نصــرالهی

اساتید راهنــما

خانم دکتر شهلا رودبار محمّدی

خانم دکتر فاطمه اطیابی

اساتید مشــاور

آقای دکتر زهیرمحمّد صراف

آقای دکتر محمّد حسین یادگاری

آذر۱۳۹۲

تقدیم به :

روح متعالی پدرم

تقدیم به :

وجود مبارک مادرم

تقدیم به :

برادرهای گرامی‌ام

و تقدیم به:

آنان که زندگی را کلاس بندگی پروردگار می‌دانند و نیک می‌اندیشند

و جز رضای الهی هدفی ندارند.

تشکر و قدردانی

پس از حمد و ستایش خداوند و سلام و دورد بر حضرت محمّد صلی الله علیه و اله و خاندان طاهرینش، که وجودمان وامدار وجودشان است؛ بر خود فرض می دانم از مقام شامخ اساتید و زحمات آنها که با همکاری، همدلی و همفکری خود انجام تحقیق حاضر را میسّر نمودند و نیز از دوستان عزیزی که در طول انجام تحقیق از لطف وجود آنها برخوردار بودام تشکر و قدردانی نمایم. امید آنکه ذکر نام این عزیزان بیانگر سپاس قلبی این حقیر از آنان باشد.

- اساتید راهنما سرکار خانم دکتر شهلا رودبار محمّدی و سرکار خانم دکتر فاطمه اطیابی.

- اساتید مشاور جناب آقای دکتر زهیر محمد صراف (حسن) و جناب آقای دکترمحمد حسین یادگاری.

- استاد و همکار تحقیق، جناب آقای دکتر اسماعیل ملارضی.

- استاد پاتولوژیست جناب آقای دکتر اکبری.

- اساتید ناظر، سرکار خانم دکتر شمس، سرکار خانم دکتر منصوری، سرکار خانم دکتر غفاری و خانم دکتر شریفی.

- معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس، جناب آقای دکتر فتح الهی.

- ریاست محترم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، جناب آقای دکتر دینارونند.

- متخصصین فارماسیوتیکس آزمایشگاه سیستم‌های نوین دارورسانی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، سرکارخانم دکتر ورشوچیان، سرکارخانم دکتر روحانی، جناب آقای دکتر گودرزی، سرکار خانم دکتر شاهوردی، جناب آقای دکترحاجی‌میری و جناب آقای مهندس اسفندیاری.

- کارشناس محترم گروه قارچ شناسی پزشکی، سرکار خانم رازقی.

- کارشناسان محترم آزمایشگاه سیستم‌های نوین دارورسانی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، سرکار خانم خسروی، سرکار خانم سلامی، سرکار خانم صابر، سرکار خانم مومنی و سرکار خانم پیشرو.

چکیده:

بتا۱-۳ گلوکان به عنوان یک عامل ایمنومدولاتور شناخته شده است که قادر است با اتصال به رسپتورهای ویژه‌ای که بر روی سلول‌های سیستم ایمنی دارد، موجب فعالیت آن سلول‌ها و متعاقب آن فعالیت ضد توموری گردد. زمانی که بتا۱-۳ گلوکان به همراه داروهای شیمی‌درمانی تجویزگردد، برایند اثر ضد توموری افزایش داشته و موجب تسریع درمان تومور می‌گردد. در تحقیق حاضر یک سیستم داروئی هدفمند در ابعاد نانو ساخته شده است که جنس حامل آن بتا۱-۳ گلوکان موجود در دیواره قارچ کاندیدا آلبیکنس است. داروی دکسوروبیسین توسط این سیستم به صورت هدفمند توسط آنتی‌بادی تراستوزوماب به سمت سلول-های +HER2 حمل می‌گردد. نانوذرات نشان‌دار شده توسط آنتی‌بادی، دارای قدرت جذب بالاتری نسبت به نانوذرات نشان‌دار نشده به درون سلول‌های +HER2 می‌باشد و به دنبال آن قدرت سلول‌کشی بالاتری در شرایط in vitro و in vivo دارد. بتا۱-۳ گلوکان ابتدا توسط لینکر سوکسینیک انهیدرید به دکسوروبیسین اتصال کووالانت برقرار نموده و سپس با افزودن شاخه‌های پلی‌اتیلن ایمین بار سطحی را به حدود ۱۸+ رسانده تا جذب بالایی به سلول توموری داشته باشد. نانوذرات توسط سونیکاتور به صورت خود تجمعی ساخته شده و نهایتاً توسط آنتی‌بادی تراستوزوماب نشان‌دار گردید. کانژوگه حاصل (Glu-Dox) توسط (FT-IR)، (1H-NMR) و (DSC) تأیید گردید. مطالعه میکروسکوپ الکترونی نیز نانوذرات گرد با سطح صاف و اندازه ۱۶۰ نانومتری را تأئید نمود. مطالعه چگونگی آزاد شدن دارو از نانوذرات در in vitro نشانگر قدرت بالای نگهداری نانوذرات حاوی داروی کانژوگه نسبت به نوع غیر کانژوگه بود. نتایج in vivo ; که پس از گذشت ۳۵ روز از توموری و درمان نمودن موش‌های ماده BALB/c توسط گروه‌های مختلف نانوذره و کنترل بدست آمد، بیانگر افزایش قدرت ایمنی ذاتی و اکتسابی موش‌های گیرنده نانوذرات بود که در این فرایند نانوذرات نسبت به دارو ها به عنوان گروه‌های کنترل، از اندیکس طحال بالاتر و میزان IFN-γ و TNF-a بالاتر و کاهش در سطح IL-4 و کاهش بیشتر حجم تومورهای تجربی، برخوردار بود که نتایج پاتولوژیک نیز مؤید میزان بالای آپوپتوز و نکروز در محل تومور موش‌های گیرنده نانوذرات با میزان بتا۱-۳گلوکان بالاتر بودند. لذا سیستم داروئی طراحی شده در درمان هدفمند سرطان که با افزایش ایمنی ضد توموری همراه است، بسیار امید بخش جلوه نموده است.

واژه‌های کلیدی: بتا۱-۳گلوکان، دکسوروبیسین، دارورسانی هدفمند، تراستوزوماب، ایمنومدولاتور.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱) کاندیدا آلبیکنس..... ۲

۱-۱-۱) دیواره کاندیدا آلبیکنس..... ۳

۱-۱-۲) بتا۱-۳ گلوکان..... ۴

۱-۱-۲-۱) خواص ایمنومدولاتوری بتا۱-۳ گلوکان..... ۶

۱-۱-۲-۲) خواص درمانی بتا۱-۳ گلوکان..... ۸

۱-۲) سرطان..... ۹

۱-۲-۱) سرطان پستان..... ۹

۱-۲-۱-۱) مراحل مختلف سرطان پستان..... ۱۰

۱-۲-۱-۲) میکرو متاستاز و متاستاز سرطان پستان..... ۱۰

۱-۳) اهمیت سیستم ایمنی در درمان سرطان (زیست درمانی)..... ۱۱

۱-۳-۱) اینترفرونها ۱۳

۱-۳-۲) اینترلوکینها..... ۱۳

۱-۳-۳) عوامل تحریک کننده کولونی (CSFs)..... ۱۴

۱-۳-۴) آنتی‌بادی مونوکلونال (MOABs)..... ۱۵

۱-۳-۵) واکسنهای سرطان..... ۱۶

۱-۳-۶) عوارض جانبی زیست درمانی ۱۶

۱-۴) نانو تکنولوژی و کاربرد نانو در پزشکی..... ۱۷

۱-۴-۱) نانو سامانه‌های دارورسانی برای درمان سرطان..... ۱۸

۱-۴-۱-۱) مزایای نانو ذرات در سیستم‌های دارورسان..... ۲۰

۱-۴-۱-۲) تکنیک هدف‌گیری از طریق نانوسامانه‌ها در درمان سرطان..... ۲۱

۱-۴-۱-۲-۱) تکنیک‌های پخش دارو..... ۲۱
۱-۴-۱-۲-۲) کنترل انتقالات غشایی..... ۲۱
۱-۴-۱-۲-۳) تکنیک‌های هدف‌گیری..... ۲۲
۱-۴-۱-۲-۳-۱) هدف‌گیری غیر فعال..... ۲۲
۱-۴-۱-۲-۳-۲) هدف‌گیری فعال..... ۲۵
۱-۵) آنتی‌بادی Trustuzumab و عوارض جانبی آن..... ۲۸
۱-۶) دکسوروبیسین و عوارض آن..... ۳۰
۱-۶-۱) سیستم‌های دارورسانی بر پایه پلی‌ساکاریدها برای انتقال دکسوروبیسین..... ۳۰
۱-۶-۲) چند روش ساخت نانوذرات بر پایه پلیمر..... ۳۱
۱-۶-۲-۱) نانوذرات هیدروژل..... ۳۱
۱-۶-۲-۱-۱) کاربردهای دارویی هیدروژل‌ها..... ۳۲
۱-۶-۳) روش‌های ساخت نانوذرات بر پایه گلوکان..... ۳۴
۱-۷) اهدف رساله..... ۳۴

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱) مواد شیمیائی و رده‌های سلولی مورد نیاز..... ۳۶
۲-۲) تجهیزات و دستگاههای مورد نیاز..... ۳۷
۲-۳) روش انجام کار..... ۳۸
۲-۳-۱) آماده سازی و نگهداری کیسه دیالیز..... ۳۸
۲-۳-۲) تهیه بافر فسفات سالین..... ۳۹
۲-۳-۳) تهیه بتا۱-۳ گلوکان با وزن مولکولی دلخواه..... ۳۹
۲-۳-۳-۱) کشت کاندیدا آلبیکنس..... ۳۹
۲-۳-۳-۲) تبدیل فرم مخمری کاندیدا آلبیکنس به فرم لوله زایا..... ۴۰

۲-۳-۳-۳) جداسازی بتا۱-۳ گلوکان از دیواره کاندیدا آلبیکنس..... ۴۰
۲-۳-۳-۴) اندازه‌گیری وزن مولکولی بتا جدا شده از دیواره کاندیدا آلبیکنس..... ۴۱
۲-۳-۴) تهیه مشتقات بتا ۳-۱ گلوکان..... ۴۱
۲-۳-۴-۱) سنتز کنژوگه بتا۱-۳ گلوکان- سوکسینیک انهیدرید (Glu-S)..... ۴۱
۲-۳-۴-۲) سنتز کوپلیمر بتا۱-۳ گلوکان - سوکسینیک انهیدرید- پلی‌اتیلن‌ایمین (Glu-Sa-PEI)..... ۴۲
۲-۳-۵) ساخت نانوذره بتا۱-۳ گلوکان (Glu)..... ۴۳
۲-۳-۶) کانژوگه نمودن Dox به Glu-Sa- ۴۴
۲-۳-۶-۱) بررسی میزان کانژوگه شدن Dox به Glu-Sa-PEI..... ۴۵
۲-۳-۷) تهیه نانو ذرات کانژوگه Glu-Dox..... ۴۶
۲-۳-۸) تهیه نانو ذرات غیر کانژوگه Glu/Dox..... ۴۶
۲-۳-۹) تعیین اندازه، پتانسیل زتا و ضریب پراکندگی نانوذرات..... ۴۷
۲-۳-۱۰) بررسی مرفولوژی نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)..... ۴۷
۲-۳-۱۱) مطالعه آزادسازی کنترل شده دارو از نانوذرات کانژوگه و غیر کانژوگه..... ۴۸
۲-۳-۱۲) هدفمند نمودن نانوذرات با داروی کانژوگه توسط آنتی بادی تراتستوزوماب (هرسپتین..... ۴۸
۲-۳-۱۳) مطالعات in-vitro..... ۴۹
۲-۳-۱۳-۱) سلول و کشت آنها..... ۴۹
۲-۳-۱۳-۲) بررسی اثر سایتوتوکسیک نانوذرات بر سلولهای 4T1 و MCF7..... ۵۰
۲-۳-۱۳-۳) بررسی اختصاصیت نانوذرات Glu-Dox-Ab نسبت به جذب توسط سلولهای 4T1..... ۵۰
۲-۳-۱۴) مطالعات in-vivo..... ۵۱
۲-۳-۱۴-۱)تومووری نمودن موشهایBALB/c mice ماده..... ۵۱
۲-۳-۱۴-۲) مطالعات بررسی میزان بقا موش..... ۵۲
۲-۳-۱۴-۳) بررسی اندیکس طحال..... ۵۲
۲-۳-۱۴-۴) بررسی سایتوکاین‌های TNF-α ، IL-4 و INF-γ..... ۵۲
۲-۳-۱۴-۵) بررسی اثر سمیت دکسوروبیسین بر عضله قلبی..... ۵۳
۲-۳-۱۴-۵-۱) بررسی میزان آنزیم‌های قلبی (LDH, CK-Mb, AST)..... ۵۳

۲-۳-۱۴-۵-۲) بررسی پاتولوژی عضله قلبی.....۵۳

۲-۳-۱۴-۶) بررسی متاستاز.....۵۳

۲-۳-۱۴-۷) بررسی پاتولوژیک درمان تومور..... ۵۳

فصل سوم: نتایج و یافته‌ها

۳-۱) استخراج بتا۱-۳ گلوکان از دیواره کاندیدا آلبیکنس.....۵۵

۳-۱-۱) تأئید بتا۱-۳ گلوکان حاصله از دیواره کاندیدا آلبیکنس توسط تست کالوز.....۵۵

۳-۱-۲) تأئید بتا۱-۳ گلوکان حاصله از دیواره کاندیدا آلبیکنس توسط طیف 1H –NMR.....۵۶

۳-۲) بررسی ساختار مشتقات بتا۱-۳ گلوکان.....۵۷

۳-۲-۱) بررسی ساختار مشتق Glu-Sa به روش 1H –NMR و IR.....۵۷

۳-۲-۲) بررسی ساختار Glu-Sa-PEI به روش 1H –NMR.....۵۸

۳-۳) بررسی اتصال کانژوگه Glu-Sa-PEI به دوکسوروبیسین(Glu-Dox) ۵۹

۳-۳-۱) بررسی کارائی اتصال دوکسوروبیسین به Glu-Sa-PEI در مقایسه با اتصال غیر کانژوگه Glu-Sa-PEI به دوکسوروبیسین (Glu/Dox).....۵۹

۳-۳-۲) بررسی ساختار کانژوگه Glu-Sa-PEI با داروی دکسوروبیسین در Glu-Dox-3 به روش 1H – NMR.....۶۰

۳-۳-۳) بررسی ساختار کانژوگه Glu-Sa-PEI در مقایسه با Glu-Dox-3 وDox به روش DSC.....۶۲

۳-۴) بررسی نانوذرات خود تجمعی کانژوگه Glu-DOX و غیر کانژوگه Glu/Dox ۶۲

۳-۴-۱) سایز و میزان پراکندگی نانوپارتیکلهای Glu-DOX و Glu/Dox.....۶۲

۳-۴-۲) مرفولوژی نانوذرات خود تجمعی Glu-Dox-3 توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM).....۶۳

۳-۵) اتصال آنتی‌بادی به نانوذرات Glu-Dox-3.....۶۴

۳-۶) مطالعات In vitro.....۶۵

۳-۶-۱) تست MTT.....۶۵

۳-۶-۱-۱) بررسی اثر سلامت نانو بتا۱-۳ گلوکان بر سلولهای سالم بدن.....۶۵

۳-۶-۱-۲) بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی نانو بتا۱-۳ گلوکان حاوی دارو و آنتی‌بادی بر سلولهای سرطانی 4T1 و MCF7 ۶۶

۳-۶-۲) بررسی میکروسکوپی کنفوکال ۶۸

۳-۶-۳) بررسی میزان آزاد سازی دارو توسط نانوپارتیکلهای با دکسوروبیسین کانژوگه (Glu-Dox-3) و غیر کانژوگه (Glu/Dox-3) ۶۸

۳-۷) مطالعات In vivo ۶۹

۳-۷-۱) نتایج اندیکس حجم تومور ۶۹

۳-۷-۲) بررسی میزان بقای موشها ۷۲

۳-۷-۳) بررسی اندیکس طحال و اثر ایمنومدولاوری نانوپارتیکل‌ها ۷۳

۳-۷-۴) بررسی تغییرات پاتولوژیکی ۷۶

۳-۷-۵) بررسی آنزیمهای قلبی ۷۷

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها

۴-۱) استخراج بتا۱-۳ گلوکان از دیواره کاندیدا آلبیکنس و بررسی ماهیت آن ۸۲

۴-۲) بررسی ساختار مشتقات بتا۱-۳ گلوکان (Glu-Saو Glu-Sa-PEI) و کانژوگه Glu-Sa-PEI به Dox ۸۸

۴-۳) بررسی نانوذرات خودتجمعی Glu–Dox ۸۹

۴-۴) بررسی ریلیز نانوذرات خودتجمعی Glu–Dox ۹۰

۴-۵) بررسی اتصال آنتی‌بادی به نانوذرات خودتجمعی و تشکیل Glu-Dox-Ab ۹۱

۴-۶) مطالعه توکسیسیته به روش MTT ۹۱

۴-۷) مطالعات In vivo ۹۲

۴-۷-۱) بررسی اندیکس توموری ۹۲

۴-۷-۲) بررسی میزان بقای موشها ۹۳

۴-۷-۳) بررسی اندیکس طحال و اثر ایمنومدولاوری نانوپارتیکل‌ها ۹۴

۴-۷-۴) بررسی تغییرات پاتولوژیکی ۹۵

پیشنهادها ۹۷

منابع.....۹۸
چکیده انگلیسی.....۱۰۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱: انواع بتا گلوکانهای قارچی و تنوع ساختاری آنها.....۵

جدول ۱-۲: رسپتورهای بتا گلوکان بر روی انواع سلولهای ایمنی.....۷

جدول ۳-۱: درصد وزنی و کارائی اتصال دارو در کانژوگه و غیرکانژوگه دکسوروبیسین به حامل Glu-Sa-PEI.....۵۹

جدول۳-۲: اندازه و PDI نانوذرات خودتجمعی کانژوگه (Glu-Dox) و غیر کانژوگه (Glu/Dox).....۶۲

جدول ۳-۳: پتانسیل زتای نانوذرات خود تجمعی در مقایسه با Glu-Sa-PEI و بتا۱-۳ گلوکان.....۶۳

جدول ۳-۴: مقایسه میزان آپوپتوز و نکروز و حضور ماکروفاژها به همراه میزان التهاب قلی و کبدی در گروه‌های گیرنده نانوپارتیکلی در مقایسه با گروه‌های کنترل (سالین، Dox و Ab).....۷۷

جدول ۳-۵: مقایسه آنزیمهای قلبی (LDH, CK-Mb, AST) دو گروه گیرنده Dox و Glu-Dox در مقایسه با گروه کنترل (سالین).....۷۸

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱: اشکال مختلف کاندیدا آلبیکنس..... ۲

شکل۱-۲: ساختمان دیواره کاندیدا آلبیکنس با تشریح پلیمر بتا۱-۳گلوکان..... ۳

شکل ۱-۳: ساختارشیمیائی سه نوع بتا گلوکان قارچی..... ۴

شکل ۱-۴: تحریک ایمنی ذاتی و اکتسابی توسط بتا گلوکان..... ۸

شکل۱-۵: هدفگیری غیرفعال با استفاده از شبکه مویرگی نشت پذیر تومور..... ۲۴

شکل ۲-۱: ساختار بتا ۳-۱ گلوکان..... ۴۱

شکل ۲-۲: ساختار کنژوگه بتا۱-۳ گلوکان- سوکسینیک انهیدرید (Glu-Sa)..... ۴۲

شکل ۲-۳: ساختار کوپلیمر بتا۱-۳ گلوکان - سوکسینیک انهیدرید- پلی‌اتیلن‌ایمین (Glu-Sa-PEI)..... ۴۳

شکل ۲-۴: ساختار کانژوگه Glu-Dox..... ۴۵

شکل ۱-۳: الگوی جذب بدست آمده از بتا۱-۳ گلوکان حاصل ازدیواره کاندیدا آلبیکنس در مقایسه با بلانک و کردلان در دستگاه اسپکتروفلورومتر (Shimadzu RF-5000)..... ۵۶

شکل۳-۱: طیف حاصل ^{1}H-NMR (500 MHz) از بتا۱-۳ گلوکان بدست آمده از دیواره کاندیدا آلبیکنس در مقایسه با طیف حاصل از کردلان (بتا۱-۳ گلوکان استاندارد)..... ۵۷

شکل ۳-۲: طیف FT-IR مربوط به Glu-Sa در مقایسه با Glu..... ۵۷

شکل ۳-۳: طیف 1H –NMR مربوط به Glu-Sa..... ۵۸

شکل ۳-۴: طیف 1H –NMR مربوط به Glu-Sa-PEI..... ۵۸

شکل ۳-۵: طیف 1H- NMR مربوط به Glu-Dox-3..... ۶۰

شکل ۳-۶: ترموگرام DSC مربوط به Glu-Dox-3 در مقایسه با Dox و Glu-Sa-PEI..... ۶۱

شکل ۳-۷: تصویرSEM نانوذرات Glu-Dox-3 در مقیاس ۲۵۰nm..... ۶۳

شکل ۳-۸: شماتیک نانوپارتیکل Glu-Dox-Ab..... ۶۴

شکل ۳-۹: منحنی استاندارد غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد.....۶۵

شکل ۳-۱۰: اثر غلظت‌های (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نانو بتا۱-۳ گلوکان بر روی لنفوسیتهای خون انسان در برابر محیط کشت RPMI با یا بدون FBS.....۶۶

شکل ۳-۱۱: اثر نانوذرات Glu-Dox-Ab و Glu-Dox در برابر کنترل (PBS) و Dox معادل 0/3 µM دکسوروبیسین در نانوپارتیکلها و داروی آزاد بر روی سلولهای 4T1 و MCF7 در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت. (mean ± SD (n = 3) و **P < 0/01) ۶۷

شکل ۳-۱۲: تصاویر کنفوکال از برداشت دارو توسط سلولهای 4T1: (A) برداشت Dox، (B) برداشت Glu-Dox-Ab، (C) برداشت Glu-Dox. (غلظت دکسوروبیسین بکار رفته µM ۰/۳ می‌باشد).....۶۸

شکل ۳-۱۳: آزاد شدن دکسوروبیسین از نانوپارتیکل Glu-Dox-3 در بافر فسفات ۱/۱۵ مولار در°C ۳۷ در pH های ۵/۳ و ۷/۴ در مقایسه با نانوپارتیکل Glu/Dox-3 در۷/۴ = pH و داروی دکسوروبیسین آزاد.....۶۹

شکل ۳-۱۴: (a) بررسی اندیکس رشد تومور در گروههای ۷ گانه موشهای توموری. (b) روند کاهش حجم تومور و درمان در موش گیرنده Glu-Dox-Ab+Glu.....۷۱

شکل ۳-۱۵: میزان بقای گروه‌های مختلف گیرنده نانوپارتیکل در مقلیسه با گروه‌های کنترل (سالین، Dox و Ab).....۷۲

شکل ۳-۱۶: اندیکس طحالی در گروه‌های مختلف نانوپارتیکل شامل (Glu-Dox-Ab+Glu ، Glu-Dox-Ab، Glu-Dox و Glu) در مقایسه با گروه‌های کنترل (سالین، Dox و Ab).....۷۴

شکل ۳-۱۷: (a) از بالابه پائین تصویر طحال و ماکروفاژها در کشت طحال در طحال گیرنده Glu-Dox-Ab+Glu در مقایسه با (b)گیرنده Dox .از بالابه پائین تصویر طحال، عدم ماکروفاژ در کشت طحال.....۷۴

شکل ۳-۱۸: بررسی میزان سطح اینترلوکینهای TNF-α، IFN-γ و IL-4 سلولهای طحالی در گروه‌های گیرنده نانوپارتیکلی در مقایسه با گروه‌های کنترل (سالین، Dox و Ab).....۷۵

شکل ۳-۱۹: تصاویر پاتولوژیک بقایای تومور در موش گیرنده Glu-Dox-Ab+Glu: (A) آپوپتوز، (B) نکروز.....۷۸

شکل ۳-۲۰: (A) آسیب عضله قلبی به همراه التهابات در گروه گیرنده Dox و شکل (B) عضله قلبی سالم در گروه گیرنده Glu-Dox در مقایسه با شکل (C) عضله قلبی سالم در گروه کنترل (سالین).....۷۸

شکل ۳-۲۱ شکل (A) آسیب کبد به همراه التهابات در گروه گیرنده Dox و شکل (B) سلولهای کبد سالم در گروه گیرنده Glu-Dox در مقایسه با شکل (C) سلولهای کبد سالم در گروه کنترل (سالین).....۷۹

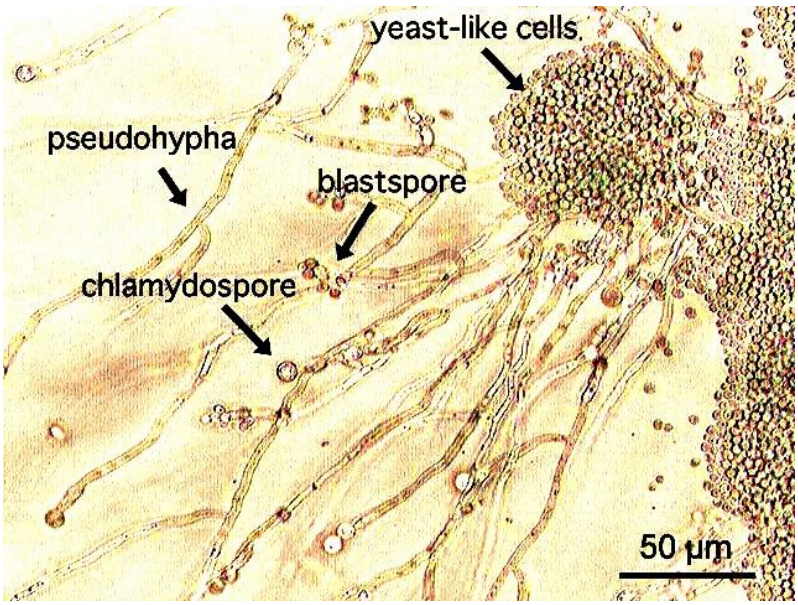
شکل ۳-۲۲: شکل (A) متاستاز در ریه گروه گیرنده Dox و شکل (B) سلولهای ریه سالم در گروه Glu-Dox ۷۹

فصل اوّل

مقدّمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱) کاندیدا آلبیکنس

کاندیدا آلبیکنس یک قارچ دوشکلی[1] و فلور نرمال بدن انسان و از جمله قارچهای حائز اهمیت در پزشکی است. این قارچ در شرائطی مثل کاهش سیستم ایمنی فرد، بیماریزا شده و قادر به ایجاد عفونت می‌باشد. این قارچ علاوه بر دو شکل اصلیِ مخمری[2] و هایفی[3]، قادر به ایجاد اشکال دیگری نظیر جوانه، لوله زایا[4]، پسودوهایف و کلامیدوسپور می‌باشد (شکل۱-۱). تغییرات مرفولوژی قارچ، متعاقب تغییرات دیواره سلولی و به دنبال پاسخ قارچ به شرائط و بحرانهای محیطی حاصل می‌شود.

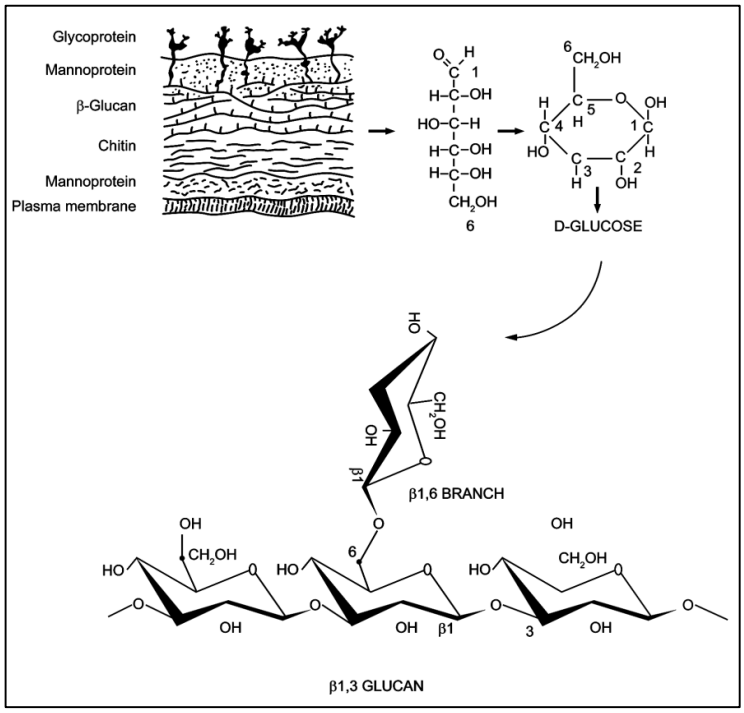


شکل ۱-۱: اشکال مختلف کاندیدا آلبیکنس (۱)

[1] Dimorphism
[2] Yeast
[3] Mycelia form
[4] Germ tube

۱-۱-۱) دیواره کاندیدا آلبیکنس

دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس از یک ساختار پیچیده و دینامیک تشکیل شده است که تقریباً ۳۰٪ وزن کل سلول را به خود اختصاص داده است. دیواره شامل یک لایه اسکلت کیتین (هموپلیمر بدون شاخه از جنس N استیلD–گلوکز) و بتا گلوکان (پلیمر شاخه دار شامل دو نوع پیوند بتا۱-۳ گلوکان و بتا۱-۶ گلوکان) می‌باشد که در یک ماتریکس مانوپروتئینی قرار دارد (شکل۱-۲). نظر به اینکه از بین انواع بتا گلوکان، بتا۱-۳ گلوکان به‌دلیل فرم ساختاری و وجود پیوندهای بتا۱-۳ گلیکوزیدی، فعال‌تر می‌باشد، از اهمیت ویژه‌ای در تحقیقات برخورداراست و به لحاظ تأثیرات سودمند تغذیه‌ای و درمانی، مطالعات گسترده‌ای متوجه بتا۱-۳ گلوکان می‌باشد (۲).



شکل۱-۲: ساختمان دیواره کاندیدا آلبیکنس و پلیمر بتا۱-۳ گلوکان