

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد فیزیک پزشکی

نانوترکیب اکسید منگنز و طلا با پوشش پلی اتیلن گلیکول در تصویربرداری دو مودالیتة تشدید مغناطیسی و توموگرافی کامپیوتری و بررسی قابلیت بارگذاری داروی ضد سرطان 5- فلورواوراسیل

نگارش:

مهدی خلیل نژاد غازانی

استاد راهنما:

دکتر ناهیده قره آغاجی

اساتید مشاور:

دکتر توحید مرتضی زاده- دکتر بهارک دیوبند

شماره پایان نامه: 64524

شهریور 1400

بسمه تعالی

گواهی اصالت پایان نامه

بدینوسیله اعلام می نماید که این پایان نامه بر اساس نتایج بررسیها/ تحقیقات انجام یافته توسط اینجانب بوده و بوسیله خودم انشا گردیده است و قبلاً بعنوان پایان نامه در سایر مقاطع و دوره های تحصیلی ارایه نگردیده است.

بدینوسیله اصالت (ORIGINALITY) و صحت نتایج این پایان نامه مورد تأیید اینجانب، استاد راهنما می باشد.

تقدیم به

پدر و مادر عزیز و مهربانم

که در سختی‌ها و دشواری‌های زندگی همواره یآوری دلسوز و فداکار
و پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بوده‌اند.

و

تقدیم به

استاد راهنمایم، سرکار خانم دکتر قره آغاجی به دلیل یاریها و راهنماییهای بی چشمداشت ایشان که
بسیاری از سختیها را برایم آسانتر نمودند،

از استاد گرامیم، جناب آقای دکتر مرتضی زاده بسیار سپاسگزارم چرا که بدون مشاوره های ایشان
تامین این پایان نامه بسیار مشکل می نمود.

با تقدیر از سرکار خانم دکتر دیوبند که همواره راهنمایی ها و مشاوره های ایشان بسیاری از سختی ها
را برایم آسان نمودند.

مقالات پذیرفته شده از پایان نامه:

1. Title: Application of Manganese Oxide (MnO) Nanoparticles in Multimodal Molecular Imaging and Cancer Therapy: A Review

ID: NMJ-2105-1598 (R1)

Authors: Mehdi Khalilnejad, tohid Mortezaazadeh, Ramin Ghasemi Shayan

Submit Date: 11 May 2021

Accept Date: 26 May 2021

Publish Date: 26 May 2021

<i>CT</i>	Computed Tomography
<i>Gd-DTPA</i>	Diethylene Triamine Pentaacetic Acid
<i>DMSO</i>	Dimethyl Sulfoxide
<i>MTT</i>	Dimethylthiazol-diphenyl Tetrazolium bromide
<i>DMEM</i>	Dulbecco's Modified Eagle's medium
<i>DLS</i>	Dynamic light scattering
<i>FA</i>	Folic Acid
<i>FTIR</i>	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
<i>Au</i>	gold
<i>HU</i>	Hounsfield Unit
T_1	longitudinal (spin-lattice) relaxation time
<i>MRI</i>	Magnetic Resonance Imaging
<i>MnO</i>	manganese oxide
<i>NPs</i>	Nanoparticles
<i>PBS</i>	Phosphate-Buffered Saline
<i>ROI</i>	Region of Interest
<i>R</i>	Relaxation rate
<i>r</i>	relaxivity
<i>TR</i>	Repetition time
<i>RPMI</i>	Roswell Park Memorial Institute medium
<i>SPIO</i>	Super Paramagnetic Iron Oxide
<i>TE</i>	Time to echo
<i>TEM</i>	Transmission Electron Microscopy
T_2	transverse (spin-spin) relaxation time
<i>VSM</i>	Vibrating Sample Magnetometer
<i>XRD</i>	X-ray diffraction

1	<u>چکیده</u>
3	<u>فصل اول: مقدمه</u>
4	<u>1-1 اهمیت و طرح مسئله:</u>
10	<u>1-2 اهداف و فرضیات:</u>
10	<u>1-2-1 هدف کلی:</u>
11	<u>1-2-2 اهداف اختصاصی:</u>
11	<u>1-2-3 اهداف کاربردی:</u>
11	<u>1-2-4 فرضیات طرح</u>
12	<u>1-3 تعریف واژه‌های اختصاصی</u>
13	<u>فصل دوم: چهارچوب پژوهش و مروری بر متون</u>
14	<u>2-1 چهارچوب کلی پژوهش</u>
15	<u>2-2 مواد کنتراست</u>
16	<u>2-2-1 مواد کنتراست CT</u>
16	<u>2-2-2 مواد کنتراست MRI</u>
16	<u>2-3 عدم مزیت مواد کنتراست متداول مورد استفاده در CT&MRI</u>
18	<u>2-4 نانو ذرات به عنوان ماده کنتراست برای CT& MRI</u>

19	<u>2-4-1 ویژگی نانوذرات منگنز و طلا</u>
20	<u>2-5 پارامترهای تصویربرداری</u>
20	<u>2-5-1 پارامترهای غیرقابل تغییر بوسیله کاربر</u>
21	<u>2-5-1 پارامترهای قابل تغییر بوسیله کاربر</u>
23	<u>2-6 بررسی متون</u>
25	<u>فصل سوم: مواد و روش کار</u>
26	<u>3-1 نوع مطالعه</u>
26	<u>3-2 مقدمه</u>
26	<u>3-3 سنتز نانوذرات</u>
27	<u>3-3-1 سنتز نانوذرات طلا</u>
27	<u>3-3-2 سنتز نانوذرات اکسید منگنز و طلا</u>
27	<u>3-3-3 سنتز نانوذرات سنتز نانوذرات اکسید منگنز و طلا با پوشش PEG</u>
28	<u>3-4 آنالیزها</u>
28	<u>3-4-1 طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR)</u>
29	<u>3-4-2 پراکندگی دینامیکی نور (DLS)</u>
30	<u>VSM 3-4-3</u>
31	<u>3-4-4 میکروسکوپ الکترونی</u>
31	<u>3-4-5 پلاسمای جفت شده ی القائی</u>

32	3-5 پروسه ی بارگذاری دارو
33	3-6 بررسی رهایش دارو
33	3-7 بررسی اثر سمیت سلولی با روش MTT
34	3-7-1 پروتکل MTT
36	3-8 تست بررسی سمیت خونی
38	3-9 آماده سازی غلظت
38	3-10 تصویربرداری سی تی اسکن
39	3-11 تصویربرداری تشدید مغناطیسی
40	3-12 آنالیز تصاویر
40	3-12-1 نرم افزار RadiAnt Dicom Viewer
41	3-12-2 نرم افزار MATLAB
42	3-12-2 تعیین مقادیر آسایش دهی r1
43	فصل چهارم: نتایج و یافته ها
44	4-1- مشخصات نانومواد سنتز شده
44	4-1-1 آنالیز FT-IR
45	4-1-2 آنالیز VSM
46	4-1-3 آنالیز TEM

46 <u>4-1-4 آنالیز ICP</u>
47 <u>4-1-5 آنالیز DLS</u>
47 <u>4-2 میزان بارگذاری دارو و محاسبه ی Capacity و Efficiency</u>
48 <u>4-3 عمل رهائش داروی 5- فلوراسیل</u>
49 <u>4-4 تست MTT و بررسی اثرات سایتوتوکسیک نانوذرات اثرات سایتوتوکسیک نانوذرات</u>
51 <u>4-5 تست Hemolysis و بررسی اثرات همولایتیک نانوذرات</u>
53 <u>4-6 شدت سیگنال MR اندازه گیری شده برای نانوذرات برپایه منگنز</u>
54 <u>4-7 مقادیر CT اندازه گیری شده برای نانوذرات برپایه طلا</u>
56 <u>فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری</u>
57 <u>5-1 بحث و تفسیر نتایج</u>
57 <u>5-1-1 تایید نانوذرات سنتز شده</u>
57 <u>5-1-2 تایید زیست سازگاری سلولی و خونی نانوذرات سنتز شده</u>
58 <u>5-1-3 قابلیت نانوذرات برپایه منگنز به عنوان ماده کنتراست MRI</u>
59 <u>5-1-4 قابلیت نانوذرات برپایه طلا به عنوان ماده کنتراست CT</u>
61 <u>5-2 نتیجه گیری</u>
62 <u>5-3 پیشنهادات</u>
63 <u>منابع</u>

چکیده

ترکیبی از استراتژی های تصویربرداری و درمانی در یک نانوسیستم برای تشخیص و درمان سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه با هدف طراحی یک نانوسیستم متشکل از دودمالیته توموگرافی کامپیوتری/تصویربرداری تشدید مغناطیسی (CT/MRI) با قابلیت بارگذاری داروی ضد سرطان 5-فلوروراسیل (5FU) انجام شد.

در این مطالعه، نانوسیستم جدید (AMP/5FU) که بر پایه ی نانوذرات طلا (Au) و اکسید منگنز (MnO) با پوشش پلی اتیلن گلیکول (PEG) برای تصویربرداری و بارگذاری 5FU در دانشکده شیمی دانشگاه تبریز سنتز شده بود، تهیه گردید. اندازه و شکل نانوذرات با استفاده از TEM، اندازه هیدرودینامیکی با دستگاه DLS، خاصیت مغناطیسی با استفاده از دستگاه VSM، سازگاری سلولی و خونی با تست همولیز، ویژگی بارگذاری و رهاسازی دارو، تضعیف اشعه ایکس با استفاده از دستگاه سی تی اسکن و زمان آسایش r_1 نانوذرات با استفاده از دستگاه MRI مورد بررسی قرار گرفت.

نانوذرات کروی دارای ویژگی پارامغناطیس، اندازه میانگین 20 نانومتر و اندازه هیدرودینامیکی 78 نانومتر بودند. نانوذرات بدون بارگذاری 5FU سازگاری بالایی تا حدود 90 درصد برای سلولهای A549 برای همه غلظت ها نشان دادند، در حالی که نانوذرات بارگذاری شده با دارو تا 89 درصد سمیت برای سلولهای سرطانی نشان دادند. نتایج تست همولیز مشخص نمود که نانوذرات دارای سازگاری خونی هستند. میزان بارگذاری دارو 5FU نود درصد به دست آمد و میزان رهایش آن وابستگی به PH حدود 73٪ را نشان داد. نانوذرات AMP/5FU ضریب تضعیف زیاد برای سی تی اسکن و همچنین زمان آسایش $r_1=4.36 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ مناسب برای MRI نشان دادند.

این نتایج پتانسیل نانوذرات به عنوان ماده کنتراست دومدالیتیه برای تصویربرداری سی تی اسکن و تشدید مغناطیسی با قابلیت بارگذاری و رهایش داروی 5FU را تایید می کند.

کلمات کلیدی: نانوذرات طلا، اکسید منگنز، 5-فلوروراسیل، توموگرافی کامپیوتری،

تصویربرداری تشدید مغناطیسی، سلولهای سرطانی A549

فصل اوّل: مقدمه

1-1 اهمیت و طرح مسئله:

در حال حاضر سرطان عامل 12٪ تمامی مرگ و میرها در سرتاسر جهان است و انتظار می‌رود تعداد موارد جدید سرطان از 10 میلیون نفر در سال 2000 به 15 میلیون نفر در سال 2020 افزایش یابد(1). این بیماری نیازمند تشخیص، درمان و پیشگیری از عوارض آن در مراحل اولیه می‌باشد. تاکنون تلاش‌های بسیاری برای تشخیص، مرحله‌بندی و ارزیابی پاسخ تومور به درمان صورت گرفته است، که معیار اصلی برای ارزیابی پاسخ تومور به درمان، بررسی تغییرات سایز تومور در تصاویر آناتومیک CT و MRI چندین هفته یا چندین ماه پس از اتمام دوره‌ی درمان است. اما مشکل اساسی این روش این است که تغییرات در حجم و اندازه تومور بسیار دیرتر از تغییرات فیزیولوژیک و بیولوژیک اتفاق می‌افتد و عوامل مداخله‌ای همچون ادم بافت مشکلات عدیده‌ای در تشخیص در تصاویر آناتومیک ایجاد می‌کند. برای رسیدن به درمان مؤثر و هدفمند نیاز به سیستم تشخیصی مناسبی که بتواند ضایعه را در مراحل اولیه به‌خوبی نشان دهد احساس می‌گردد. تصویربرداری مولکولی نگاهی جدید برای تحقیقات بیومدیkal به‌منظور مشاهده خصوصیات و مانیتور کردن پروسه‌های بیولوژی در سلول‌ها، بافت‌ها و ارگانیس‌م‌ها با استفاده از مدالیته‌های حساس و دقیق و همچنین مکانیسم‌های کنتراست زایی دارد تا بتواند امکان تشخیص دقیق‌تر بیماری‌ها از جمله سرطان‌ها در سطح سلولی و فیزیولوژی بافت‌ها و تعیین درجه تومور را در اختیار کاربر قرار می‌دهد. بنابراین استفاده از روشهای تصویربرداری فانکشنال از جمله تصویربرداری مولکولی که تغییرات فیزیولوژیک و بیولوژیک را زودتر از تغییرات آناتومیک و گسترش متاستاز نشان می‌دهد، می‌تواند نقش اساسی در تشخیص و پیگیری درمان سرطان ایفا

کند. در این حالت با افزایش حساسیت، تصویربرداری در ابعاد سلولی امکانپذیر می‌شود. تصویربرداری مولکولی نه تنها به عنوان یک ابزار برای تشخیص و مرحله بندی سرطان بکار گرفته می‌شود، بلکه اطلاعات قابل توجهی برای جراحی، رادیوتراپی، شیمی درمانی و پیگیری درمان، نیز فراهم می‌کند. در این مطالعه تصویربرداری مولکولی با استفاده از روش تصویربرداری تشدید مغناطیسی با استفاده از مواد کنتراست را در مقیاس نانو موردنظر است.

مزیت روش MRI نسبت به سایر روش‌های تصویربرداری کنتراست بافت نرم مطلوب، رزولوشن فضایی بهتر و عدم استفاده از پرتوهای یونیزان است. هر چند که تصویربرداری MRI می‌تواند برای تصویربرداری نواحی مختلف بدن استفاده شود، ولی MRI به طور ذاتی دارای حساسیت پایینی است و ضروری است که این کاستی با روش‌های نوین برطرف شود. برای بهبود حساسیت نباید تنها به بهبود تجهیزات مانند (تصویربرداری با شدت میدان مغناطیسی بالا، تصویربرداری اسپکترال و ساخت الگوریتم‌های بازسازی جدید)، اقدام کرد بلکه باید مواد کنتراست‌زای جدید را سنتز و بهینه کرد. در اصل شدت سیگنال بدست آمده در MRI وابسته به دانسیته پروتون‌های محل موردنظر، زمان‌های آسایش طولی (T_1) و عرضی (T_2)، نرخ دیفیوژن ملکول‌های آب، شیفت شیمیایی و توالی پالس موردنظر است. دانسیته پروتونی محل موردنظر و زمان‌های آسایش به شدت وابسته به پروتون‌های محیط هستند و در نتیجه باعث ایجاد کنتراست ذاتی بین بافت‌های بیولوژیکی مختلف می‌شوند. با این وجود اختلاف بین بافت‌های سالم و غیرطبیعی مجاور اندک است که باعث ایجاد کنتراست ذاتی پایینی می‌شود. استفاده از مواد کنتراست‌زای خارجی باعث تغییر در زمان‌های آسایش پروتون‌های مجاور هم شده و بدین ترتیب کنتراست تصویر بهبود پیدا می‌کند(2).

از بین 7 تا 10 میلیون اسکن MRI که سالیانه در سرتاسر جهان انجام می‌گیرد، 30 تا 50 درصد با استفاده از مواد کنتراست‌زا می‌باشد که این اهمیت و گستردگی استفاده از این مواد را نشان می‌دهد. (3).

مواد کنتراست‌زا در تصویربرداری تشدیدمغناطیسی به دو دسته تقسیم بندی می‌شوند. مواد کنتراست‌زای مثبت، موادی هستند که با حضور خود سبب کوتاه شدن مقدار آسایش اسپین-شبکه¹ (T_1) می‌گردند و بنابراین شدت سیگنال افزایش یافته تصاویر را روشن‌تر نمایان می‌کنند. درحالی‌که مواد کنتراست‌زای منفی با کاهش زمان آسایش اسپین-اسپین² (T_2) باعث کاهش سیگنال و تیره‌تر شدن تصویر می‌شوند. همچنین نوع و غلظت کنتراست‌زاهای، چگونگی تأثیر مواد در محیط زیستی و فاصله‌ی زمانی میان ورود ماده و زمان تصویربرداری از عواملی است که روی کنتراست اثر دارد.

مواد کنتراست‌زای مرسوم در کلینیک دارای مقیاسی بزرگتر بوده و تصویربرداری در سطح ملکولی با استفاده از این ترکیبات فراهم نمی‌شود. این ترکیبات در تصویربرداری تشدیدمغناطیسی بطور یکنواخت در کل بدن توزیع می‌گردند و بصورت هدفمند در ناحیه موردنظر برای تصویربرداری تجمع نمی‌کنند که باعث کاهش غلظت ترکیب در بدن شده و نیاز به تزریق با دز بالا و حتی تزریقات بیشتر می‌باشد که نگرانی‌های مربوط به سمیت بخصوص در مورد ترکیبات گادولینیوم‌دار در بیماران نارسایی کلیوی مطرح است. بنابراین نیاز به طراحی و سنتز مواد کنتراست‌زا در مقیاس نانو می‌باشد تا بتوان با تزریق دز کمتری تصویربرداری نمود و بدین ترتیب نگرانی در مورد سمیت

¹ - Spin-lattice relaxation time

² - Spin-Spin relaxation time