

آشکار سازی آگزوزم های مترشح از سلولهای سرطان ریه در بستر میکروفلوئیدیک به روش ایمونوفلورسانس

کوشا ایرانی، رویا کلاهچی، مسلم صدقی، حسین نادری منش و عبدالله اله وردی*

ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۰۶

چکیده

سرطان ریه عامل بیشترین موارد مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان است و هرساله منجر به مرگ میلیون‌ها نفر در جهان می‌شود، بطوریکه آمار مرگ بعلت سرطان ریه از مجموع دو سرطان بعدی یعنی سرطان سینه و پروستات بیشتر است. نتیجه درمان در سرطان ریه در مقایسه با سرطان سینه و پروستات نامطلوب‌تر است، زیرا اکثر بیماران مبتلا به سرطان ریه در مرحله‌ای از بیماری تشخیص داده می‌شوند که متاستاز رخ داده است. علت عدم تشخیص زود هنگام سرطان ریه، تشابه علائم و نشانه‌های سرطان با علائم بیماران ریوی و نبود روشی که بتوان آنرا در مراحل اولیه شناسایی کند. امروزه توجه زیادی به نشانگرهای زیستی نظیر میکروRNA، آگزوزمها و تتراسپانین‌ها به عنوان بیومارکرهایی که می‌توان اطلاعاتی از وقایع داخل سلول بدست آورد شده است. در این تحقیق، ابتدا چیپ میکروفلوئیدیک طراحی و با روش لیتوگرافی نوری ساخته شد، سپس آگزوزم‌های مترشح از سلولهای سرطان ریه داخل چیپ میکروفلوئیدیک تثبیت شدند، سپس توسط آنتی بادی های CD63 و CD151 کنژوگه با FITC آشکار سازی شدند. آگزوزمهای تثبیت شده با این روش از چیپ استخراج و با میکروسکوپ نیروی اتمی و DLS مطالعه شدند. متوسط سایز آگزوزمها بدست آمده توسط DLS، ۱۹ تا ۳۷ نانومتر بود. متوسط سایز آگزوزمها محاسبه شده توسط میکروسکوپ نیروی اتمی برابر ۳۵-۳۷ نانومتر است که با نتایج بدست آمده توسط DLS مطابقت دارد.

واژه های کلیدی: سرطان ریه، میکروفلوئیدیک، آگزوزوم، نشانگرهای مولکولی، آنتی بادی های CD63 و CD151

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۷۴۹، پست الکترونیکی: a-allahverdi@modares.ac.ir

مقدمه

این مرحله به احتمال زیاد تومور متاستاز داده است [۶]، [۹]. در اکثر موارد بالینی بیشترین ضایعات ایجاد شده در سرطان ریه در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود به همین دلیل پزشکان زمان لازم برای درمان بیمار را ندارند. بنابراین محققان سعی بر این دارند که با توسعه روش‌های نوین و با تمرکز ویژه بر نشانگرهای مولکولی بر این مشکل غلبه کنند

در سلولها و موجودات زنده، آگزوزمها دو وظیفه بیولوژیکی را بر عهده دارند: حذف پروتئین‌هایی که کارایی آنها به اتمام رسیده و دیگری انتقال بیومولکولهای ویژه بین

سرطان ریه یکی از شایعترین سرطان های شناخته شده است و هرساله تعداد زیادی از بیماران مبتلا به این سرطان به دلیل عدم تشخیص به موقع جان خود را از دست می‌دهند. در حالی که اگر این بیماری در مراحل اولیه تشخیص داده شود در صد زنده ماندن مبتلایان به بیماری، به طور چشمگیری افزایش پیدا می‌کند. روش‌های تشخیصی که در حال حاضر در آزمایشگاه‌ها و مراکز درمانی استفاده می‌شوند اغلب مبتنی بر تصویر برداری می باشند، به عبارت دیگر زمانی قادر به مشاهده تومور هستند که قطر تومور به یک سانتی متر رسیده باشد و در

اختصاصی است.[۲]. Zhao و همکاران با استفاده از چیب میکروفلوئیدیک، آنتی بادی EpCAM ، CA125 ، CD9 ، CD81 و CD63 تثبیت کردند و از پلاسمای افراد مبتلا به سرطان تخمدان بعنوان منبع آگزوزم استفاده کردند. نتایج نشان داده در افراد مبتلا به سرطان تخمدان، آگزوزمهای حاوی آنتی بادی های فوق الذکر نسبت به افراد سالم افزایش قابل ملاحظه پیدا می کنند [۹]. He و همکاران با استفاده از آنتی بادی تومور (EpCAM و CA125) و مارکرهای آگزوزومی (CD63 ، CD81 و CD9) که بر روی کانالهای میکروفلوئیدیک ساخته شده از PDMS تثبیت شده بود توانسته آگزوزومهای مترشح از سلولهای سرطان ریه غیر کوچک را تثبیت کرده، سپس با استفاده از بافر لیز کننده تخریب و پروتین های سطحی آگزوزم را تعیین کنند. [۴].

در اینجا ما با طراحی و ساخت یک تراشه میکروفلوئیدیک که قابلیت جداسازی آگزوزومها را دارد روش جدیدی برای تشخیص زود هنگام سرطان ریه را ارائه می دهیم. این تراشه میکروفلوئیدیک از طریق آنتی بادی هایی که بر روی سطح تثبیت می شود، آگزوزوم های موجود در محیط کشت و پلاسمای را به دام می اندازد و با نشانگرهای فلورسانس کتزوگه شده با آنتی بادی قابل رویت می گردد.

مواد و روشها

ساخت تراشه میکروفلوئیدیک: از طرح تراشه میکروفلوئیدیک طراحی شده در مطالعه قبل استفاده شد. طرح مورد نظر بر روی سیلیکون با استفاده از روش لیتوگرافی نوری بوسیله ی تایش نور UV بر روی فتورزیست SU-8 مدل ۲۰۵۰ ساخته شد [۵]. اساس طراحی این الگو بر مبنای جریان حداکثری در وسط کانال است و کناره های کانال جریان کند می شود و جریان حداقلی داخل اشکال ذوزنقه ایی تعبیه شده برقرار می باشد. جهت شبیه سازی جریان داخل کانال از نرم افزار

سلولها از طریق مایعات بیولوژیکی نظیر خون و پلاسمای [۷]. مطالعات نشان داده که سلولهای سرطانی مقادیر بیشتری از وزیکولهای خارج سلولی آزاد می کنند که در فرایند تبدیل سلولهای غیر متاستاری به متاستازی نقش دارند[۳]. مطالعات اخیر نشان داده وزیکولهای خارج سلولیدکه توسط سلولهای سرطانی آزاد می شود محیط اطراف تومور را تغییر می دهند و در تبدیل سلولهای stromal به سلولهای رگ ساز، پیش متاستازی یا سلولهای مهار کننده تومور نقش دارند [۱۰]. آگزوزومهای آزاد شده از سلول سرطانی، بر سطح خود انبوهی از آنتی ژنهای توموری دارند که از این آنتی ژن ها می توان در تشخیص های غیر تهاجمی و زود هنگام سرطان و همچنین نظارت بر روند درمان استفاده کرد.

در روشهای سنتی ، جداسازی آگزوزوم ها با استفاده از اولتراسانتریفیوژ انجام می شود ولی این روش نمی تواند آگزوزومها را از سایر ساختارهای وزیکولی یا پروتیین های بهم چسبیده تمایز دهد. روش های دیگر مانند وسترن بلات و سنجش های ایمونولوژی، فرایندهای زمانبری هستند که به مقدار زیادی از آگزوزوم جدا شده از خون یا محیط کشت احتیاج دارند[۹].

تحقیقات بر روی جداسازی آگزوزومها از طریق روشهای مبتنی بر میکروفلوئیدیک از سال ۲۰۱۰ تا کنون انجام شده است و مزایای خود را مانند حجم کم نمونه ی مصرفی، هزینه کم و زمان کارکرد کوتاه را به اثبات رسانده است. تکنیک های میکروفلوئیدیک که تا کنون برای جداسازی آگزوزوم ها استفاده شده است به دو دسته طبقه بندی می - شوند: روش های جداسازی مبتنی بر اندازه وزیکولها و روش های جداسازی مبتنی بر بیو مارکرهای سطحی.

استفاده از روش های ایمنی سنجی برای جداسازی آگزوزومها، از دیگر روشها مطمئن تر است زیرا در سایر روش های جداسازی عواملی نظیر اندازه، غلظت و... باعث افزایش خطا شده بعلاوه واکنش آنتی بادی - آنتی ژن کاملاً

و سوپرناتانت را دور ریخته و رسوب ته نشین شده را که آگزوزم خالص می باشد در بافر PBS حل کرده و تا زمان مصرف در یخ (حدود صفر درجه سانتیگراد) قرار می گیرد.

تعیین اندازه ذرات با استفاده از پراکندگی نور دینامیکی (DLS): پراکندگی نور دینامیکی روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول ها و سوسپانسیون استفاده می شود. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می رود. در این روش، از روی حرکت براونی ذرات در فاز سیال می توان توزیع ابعاد ذرات در یک محلول را مشخص کرد. این دستگاه برای تعیین توزیع اندازه ذرات، حرکت براونی ذرات مورد آزمایش را اندازه‌گیری می‌کند. اندازه‌گیری حرکت براونی ذرات بوسیله محاسبه میزان نوسانات در شدت پرتوهای نور متفرق شده توسط ذرات تعیین می‌گردد. این دستگاه از روی تغییرات الگوی نقطه‌ای که به صورت کم‌نور شدن و پرنور شدن نقاط تیره و روشن است، می‌تواند تغییرات شدت پرتوهای نور متفرق شده توسط ذرات را محاسبه کند که تعیین شدت تفرق پرتوهای نور، به اندازه‌گیری حرکت براونی ذرات منتهی می‌شود. سرعت حرکت براونی ذرات با اندازه آنها در ارتباط است (معادله استوک - انیشتین)، به طوری که حرکت براونی ذرات بزرگتر، آرام‌تر از حرکت براونی ذرات کوچک‌تر است. پس هر چه ذراتی که مورد آزمایش قرار می‌گیرند بزرگتر باشند، شدت نوسانات و یا تغییرات الگوی نقطه‌ای آنها نیز آرام‌تر است و در نتیجه شیب نمودار نزولی همبستگی در این ذرات در محدوده زمانی مشخص، با شیب کندتری سقوط می‌کند. با استفاده از الگوریتم‌های بدست آمده از نرخ شیب نزولی نمودار همبستگی، این دستگاه می‌تواند توزیع اندازه ذرات مورد آزمایش را بر حسب شدت نور متفرق شده از ذرات ارائه دهد.

Comsol Multiphysics نسخه ۵٫۵ استفاده شد. تراشه مورد نظر به عنوان مستر چیپ در نظر گرفته می شود و از پلی مر (Polydimethylsiloxane (PDMS، جهت کپی برداری استفاده گردید. بدین ترتیب از ترکیبی با نسبت ۱۰:۱ وزنی از پلی مر PDMS و Curing agent استفاده شده، پس از مخلوط کردن پلیمر، آن را روی مستر چیپ سیلیکونی ریخته، حباب زدایی توسط دسیکاتور خلا بمدت ۳۰ دقیقه انجام شده، سپس آن را جهت پلیمر شدن به مدت یک شب در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از مدت زمان مذکور، هنگامیکه PDMS کاملاً پلیمریزه شد آن را از روی تراشه سیلیکونی جدا کرده، سپس محل ورود و خروج نمونه (reservoir) بر روی تراشه PDMS سوراخ گردید. در مرحله بعد، تراشه PDMS و اسلاید شیشه ای جهت ایجاد گروه های هیدروفیل در داخل دستگاه Harrick plasma cleaner به مدت ۴۵ ثانیه در مد Hi قرار داده شد و سپس تراشه PDMS بر روی اسلاید شیشه ای قرار گرفته و با قرار دادن در دمای ۹۵ درجه به مدت زمان ۲ دقیقه باعث تشکیل پیوند کوالانسی و اتصال محکم و دائمی شد. تراشه مستر چیپ قابلیت استفاده مکرر جهت تهیه کپی با PDMS را دارد.

استخراج آگزوزم از سلولهای سرطان ریه: از رده سلولی A549 (لاین سلول سرطانی ریه) برای کشت سلولی استفاده گردید. دو روش پیشنهاد شده برای استخراج آگزوزم موجود بود که در روش اول مایع رویی سلول های کشت داده شده جدا شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ دور / دقیقه، سانتریفیوژ گردید و سپس محیط فوقانی از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد. در روش دوم به منظور تهیه آگزوزم خالص از اولتراسانتریفیوژ با دور بالا استفاده شد. جهت این امر ابتدا محیط رویی سلول های کشت داده شده را پس از سانتریفیوژ در مرحله قبل (۱۴۰۰۰ دور / دقیقه) را به مدت ۹۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتیگراد اولتراسانتریفیوژ کرده

نیروی اتمی Nanosurf Bio-AFM Swiss مورد مطالعه قرار گرفت.

تثبیت لینکر، انتی بادی در کانالهای میکروفلویدیک:
سطحی PDMS جهت اتصال انتی بادی باید بهینه و آماده شود. از آنجایی که پلیمر PDMS آب‌گریز است ابتدا باید توسط پلاسما گروه‌های هیدروفیل -OH در سطح اولین مرحله، تثبیت لینکر Glycidyoxypropyl trimethoxysilane (GPTMS) می‌باشد که بر روی سطح PDMS انجام گرفت. بدین منظور غلظت ۲٪ از لینکر در متانول را آماده کرده و در کانال میکروفلویدیک ساخته شده از PDMS تزریق گردید و به مدت ۲ الی ۳ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد با جریان آهسته که بوسیله پمپ سرنگی ایجاد می‌شود بصورت جریان بسته به حرکت درآورده شد تا لینکرها با سطح، اتصال مناسب را برقرار کنند. گروه‌های اپوکسی در لینکر بستر مناسبی را برای اتصال انتی بادی (CD63-FITC) فراهم می‌کنند. پس از مدت زمان مناسب، کانال میکروفلویدیک مورد نظر با متانول شست و شو داده و تحت گاز نیتروژن خشک گردید، سپس انتی بادی اول (CD63-FITC) اضافه شد. غلظت مناسب انتی بادی $1/1000 \text{ mg.mL}^{-1}$ می‌باشد. این غلظت را تهیه کرده و به ورودی چیپ ۱۰۰ میکرولیتر از انتی بادی اضافه نموده و به مدت حداقل ۲ ساعت در دمای محیط با جریان مشخص به حرکت درآورده شد. بعد از گذشت زمان فوق‌الذکر جهت اتصال انتی بادی، آن را با بافر PBS شست و شو داده تا اتصالات غیر اختصاصی از بین برود. در مرحله ی بعد ۱۰۰ میکرولیتر از آگزوزوم خالص شده را به آرامی وارد چیپ کرده و حدود ۱ ساعت بدون حرکت اجازه داده می‌شود اتصال بین بیومارکر موجود در آگزوزوم و انتی بادی برقرار شود. سپس کانال با بافر شستشو داده شد و با میکروسکوپ فلورسنت Olympus IX81 کانالها بررسی و مطالعه شدند. لازم به ذکر است CD63 مارکر عمومی است که روی همه آگزوزوم های انسانی (چه سالم و چه آگزوزمی) وجود دارد. در

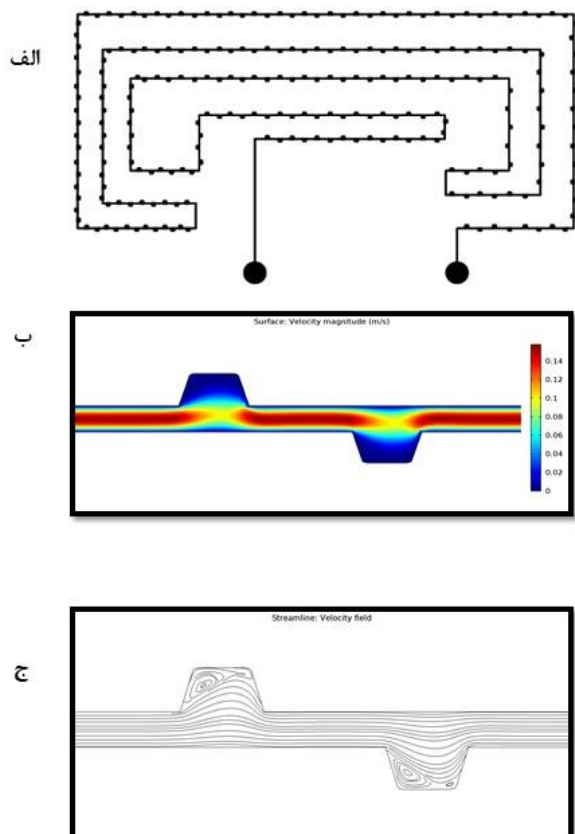
جهت تعیین سایز آگزوزوما به روش پراکندگی نور دینامیکی، حدود ۱ میلی لیتر از نمونه آگزوزوم خالص شده را در کووت دستگاه ریخته و داده‌ها توسط دستگاه زتا سائزر برند Malvern بدست آمد.

نشان دار کردن آگزوزوم: جهت اطمینان از وجود آگزوزوم مترشح از سلول سرطان ریه (A549) به آگزوزوم خالص بدست آمده از مرحله قبل، ۳ میکرولیتر از انتی بادی با غلظت $1/1000 \text{ mg.mL}^{-1}$ اختصاصی (CD151) کنژوگه با FITC، اضافه گردید. اتصال انتی بادی با میکروسکوپ فورسانس Olympus IX81 تصویر برداری شد [۴].

بررسی مورفولوژی آگزوزوم ها با میکروسکوپ نیروی اتمی (Atomic force microscopy= AFM):
میکروسکوپ نیروی اتمی پرکاربردترین میکروسکوپ روبشی است. به کمک آن می‌توان توپوگرافی سطح (تصویر سه بعدی)، زبری سطح، تصویر فاز، تصویر اصطکاک، خواص مغناطیسی و ضخامت تک لایه را مورد بررسی دقیق قرار داد. این میکروسکوپ از یک پروب کانتی لیور (Cantilever) که یک نوک سوزنی مخصوص دارد برای ارزیابی سطح استفاده می‌کند که معمولاً از جنس سیلیکون است. نوک سوزنی سطح نمونه را روبش می‌کند. در این دستگاه از نور لیزر استفاده می‌شود. باریکه لیزر به صورت مداوم به کانتی لیور در حال روبش برخورد کرده و کوچک ترین انحراف پرتو در حال تابش که متاثر از حرکت روبشی کانتی لیور است توسط یک آشکارساز تجزیه و تحلیل می‌شود.

جهت آماده سازی لام جهت عکسبرداری با میکروسکوپ AFM، لام مورد نظر با استون شست و شو داده شد و پس از خشک شدن در دمای ۶۰ درجه، مقدار ۵۰-۷۰ میکرولیتر از مایع آگزوزوم بعد از اولترا سانتریفیوژ روی لام ریخته شد. این لام به مدت ۱-۲ ساعت در دمای اتاق جهت خشک شدن قرار گرفت و سپس با میکروسکوپ

به صورت جریان لامینار تک فاز شبیه سازی شد و با توجه به رقیق بودن برای شبیه سازی از ویژگی‌های فیزیکی آب در دمای اتاق استفاده شد. الگوی طرح مورد نظر در شکل ۱-الف، پروفایل جریان سیال در کانال در شکل ۱-ب، و پروفایل خطوط جریان در کانال در شکل ۱-ج نشان داده شده است.



شکل ۱-الف الگوی طرح استفاده شده، ۱-ب نتایج شبیه سازی. پروفایل جریان در کانال، ۱-ج نتایج شبیه سازی. خطوط جریان را نشان می‌دهد

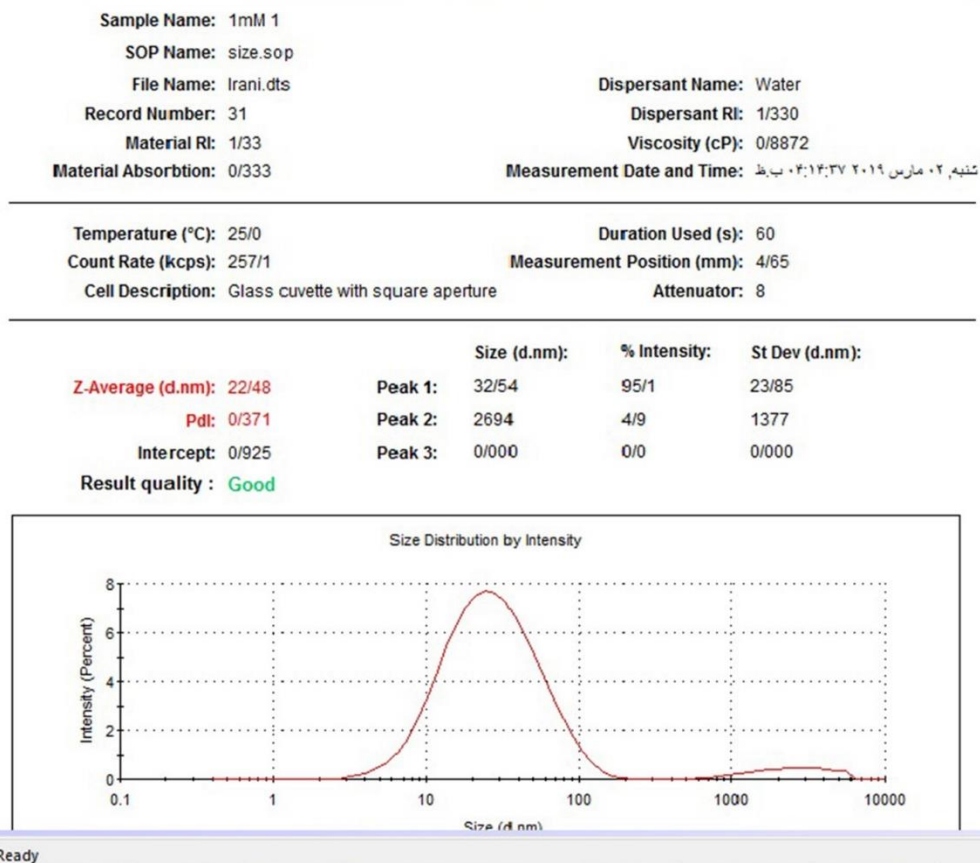
اندازه گیری سائز آگزوزم: پراکندگی دینامیکی نور یکی از روشهای دقیق، سریع، تکرارپذیر و نسبتاً کم هزینه در اندازه گیری شعاع هیدرودینامیکی و سایر مشخصه های دینامیکی نانوذرات معلق در یک مایع است [۸]. سائز آگزوزومها توسط بررسی تفرق دینامیکی نور (DLS) ارزیابی شد. سنجش توزیع تعداد توسط DLS پیک حدوداً ۳۵ نانومتر را برای جمعیت آگزوزومهای استخراج شده نشان می‌دهد.

ادامه جهت شناسایی مارکر اختصاصی سرطان ریه که CD151 است و در ۹۸٪ سلولها و آگزوزمهای سرطان ریه بیان می‌شود از آنتی بادی CD151-FITC استفاده شد. جهت این امر، کلیه مراحل فوق نظیر فعال کردن سطح با پلاسما، عامل دار کردن با لینکر GPTMS، خشک کردن با گاز نیتروژن انجام شد و در مرحله آخر از آنتی بادی CD151-FITC استفاده شد و وجود یا عدم وجود آگزوزم حاوی مارکر سرطانی با میکروسکوپ فلورسنت Olympus IX81 مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که چپ مورد استفاده را زیر میکروسکوپ قرار داده و نقاط رنگی که نشان دهنده ی محل هایی است که آنتی بادی متصل شده است بررسی شدند.

نتایج

الگوی طرح میکروفلویدیک: الگوی طرح میکروفلویدیک بر مبنای سادگی جهت ساخت و دست ورزی است. بدین معنی که یک ورودی و یک خروجی داشته و جهت افزایش نسبت سطح به حجم اشکال دوزنقه ایی تعبیه شد تا سرعت جریان در این اشکال به حداقل رسیده و مناطق مرده (Dead zone) تشکیل گردد. این طرح میکروفلویدیک در مطالعه قبلی نیز استفاده شده [۵] و در شکل ۱ الف نشان داده شده است. طول میکروکانال ۴۰۰۰۰ میکرومتر در نظر گرفته شد، عرض کانال ۴۰ میکرومتر و ارتفاع ۵۰ میکرومتر در نظر گرفته شد. الگوی کانال با نرم افزار Adobe Illustrator CC2014 ترسیم شد و ماسک مورد نظر از شرکت انتشارات رسا تهیه شد.

معادلات حاکم در جریان کانالها با استفاده از نرم افزار کامسول مولتی فیزیک نسخه ۵٫۵ شبیه سازی شد. به خاطر تقارن هندسه کانال شبیه سازی به صورت دو بعدی صورت گرفت. هندسه مدل شده عبارت است از کانالی با عرض ۴۰ میکرو متر با خانه‌هایی دوزنقه شکل به صورت یک در میان، در چپ و راست کانال ایجاد شده است. فاصله هر دوزنقه از کناری ۱۵۰ میکرومتر می باشد. جریان



شکل ۲ - نمودار سنجش اندازه آگروزوم ها توسط DLS توزیع سایز زنگوله‌ای شکل با پیک ذراتی با سایز حدودا ۳۷ نانومتر را نشان می‌دهد.

مشخص است، شکل ۳-ج اندازه دقیق متوسط آگروزوم ها سایزی برابر ۳۵-۳۷ نانومتر را نشان میدهد.

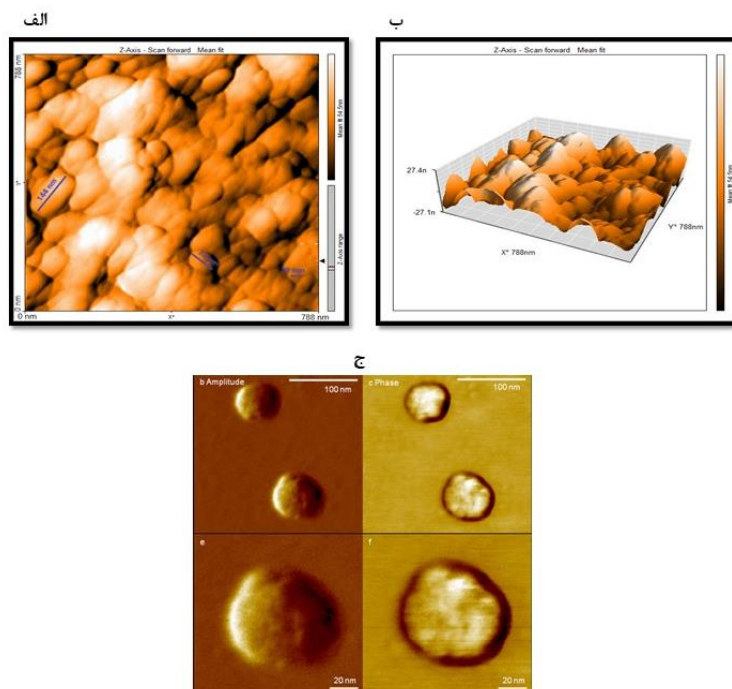
اطلاعات تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ نیروی اتمی به صورت خلاصه در جدول ۱ نمایش داده شده است :

جدول ۱ - مشخصات تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی

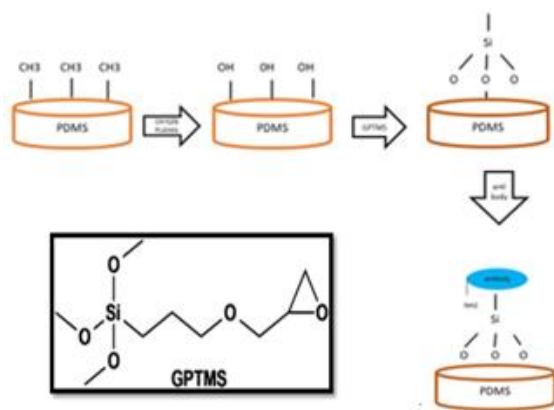
1	Image size	788 nm
2	Time/line	780 ms
3	Point/line	512
4	Set point	70%
5	Vibration freq.	160.086 kHz
6	Vibration ampl	500 mV
7	Operating mode	Non-contact
8	Cantilever type	Tap 190AI-G

همانطور که در شکل ۲ مشخص است بازه ی تغییرات سایز ذرات موجود در نمونه محدود بوده و پیک حدودا ۳۵ نانومتر را برای جمعیت آگروزوم‌های استخراج شده نشان می‌دهد که نشان دهنده ی کارایی چپ و استخراج آگروزوم به صورت خالص است.

تصویربرداری آگروزوم با میکروسکوپ نیروی اتمی:
تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ نیروی اتمی، آگروزوم‌های با اندازه‌های مختلف را نشان می‌دهد. شکل ۳-الف تصویر دو بعدی از آگروزوم‌ها را نشان می‌دهد که بزرگترین آگروزومی که در تصویر مشاهده می‌شود قطر ۱۴۴ نانومتر دارد و کوچکترین آگروزوم با قطر ۱۹ نانومتر می‌باشد و بیشترین تراکم آگروزومها، قطر ۳۷ نانومتر را نشان می‌دهند. شکل ۳-ب تصویر سه بعدی از آگروزوم‌ها می‌باشد که پستی‌ها و بلندی‌ها به وضوح



شکل ۳- الف تصویر دوبعدی گرفته شده با میکروسکوپ نیروی اتمی از آگروزوم‌های تثبیت شده بر روی لام، ۳-ب تصویر سه بعدی از آگروزوم‌های تثبیت شده بر روی لام، ۳-ج سایز دقیق متوسط آگروزوم‌ها



شکل ۴- نحوه اتصال لینکر به PDMS و انتی بادی - ساختار شیمیایی لینکر GPTMS

تثبیت لینکر، انتی بادی در کانالهای میکروفلوئیدیک: در حالت طبیعی، سطح PDMS به علت گروه هیدروفوب CH_3 تمایلی به اتصال به لینکر ندارد. اکسیداسیون سطح PDMS در فرایند پلازما برخی از گروه‌های متیل را حذف نموده و موجب ایجاد انتهای سیلانول (SiOH) بر سطح آن شده و در حقیقت ستون PDMS حاوی گروه‌های هیدروکسیل می‌شود. سطح اکسید شده PDMS وارد تماس متقابل با شیشه شده و یک اتصال محکم و غیر قابل برگشت با آن ایجاد می‌کند. همچنین این تغییر PDMS را قابل اتصال با لینکرهایی از جنس سیلان نظیر GPTMS می‌کند. این ترکیبات از یک طرف با گروه‌های OH - ایجاد شده (توسط پلازما) در PDMS متصل می‌شود و از طرف دیگر با داشتن گروه‌های اپوکسی به گروه‌های NH_2 - انتی بادیها متصل می‌شود. حلال اصلی سیلانها تولوئن می‌باشد. از آنجایی که تولوئن باعث خوردگی و نهایتاً بسته شدن کانال‌های میکروفلوئیدیک می‌شود حلالهای مختلفی مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت متانول انتخاب شد. چگونگی این فرایند در شکل ۴ نشان داده شده است.

بررسی اتصال انتی بادی های CD63 و CD151 به آگروزوم‌ها ی مترشح از سلولهای سرطان ریه: فلوروسانس یکی از روش‌های متداول در تصویر برداری زیست‌شناختی است. میکروسکوپ فلوروسانس به میکروسکوپی اطلاق می‌شود که در آن برای ایجاد یک تصویر از خاصیت فلوروسانس استفاده شود. در پدیده فلوروسانس مولکول، یک فوتون با طول موج خاص را

جذب و سپس آن را با طول موج بلندتری منتشر می‌کند. بنابراین نور متفرق شده از سطح سلول را می‌توان از نور تابیده شده به سلول تفکیک کرد. جهت اطمینان از اتصال مارکر آگزومی (CD63) و مارکر اختصاصی سرطان ریه (CD151)، دو مرحله آزمایش انجام شد که در مرحله اول ۱ میکروایتر از آنتی بادی

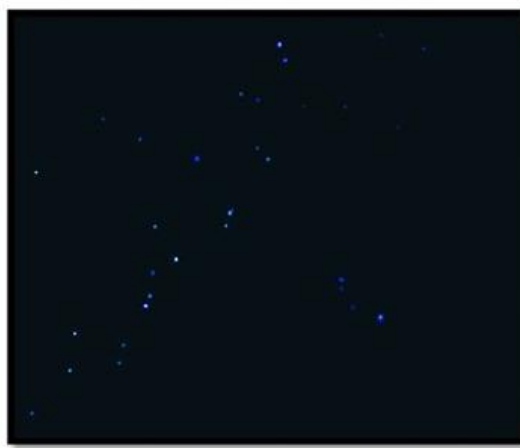
جذب و سپس آن را با طول موج بلندتری منتشر می‌کند. بنابراین نور متفرق شده از سطح سلول را می‌توان از نور تابیده شده به سلول تفکیک کرد.

جهت اطمینان از اتصال مارکر آگزومی (CD63) و مارکر اختصاصی سرطان ریه (CD151)، دو مرحله آزمایش انجام شد که در مرحله اول ۱ میکروایتر از آنتی بادی

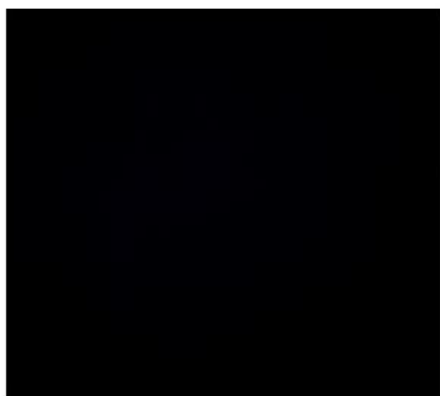
الف



ب



ج



شکل ۵ - نتایج اتصال آنتی بادی CD 63 و DPH (الف)، CD151 (ب) و کنترل بدون آنتی بادی (ج) به آگزوم های مترشح شده از سلولهای A549 سرطان ریه

دارای نشانگر FITC می باشد که در حضور نور UV به رنگ سبز دیده می شود. فرآیند میکروفلوئیدیک بر طبق پرتوکل انجام گردید و تصاویر زیر بیانگر اتصال آگزوم با آنتی بادی ها در داخل تراشه است که با میکروسکوپ فلورسنت تصویربرداری شده است: (شکل ۶)

تثبیت و آشکار سازی آگزوم ها در کانال های تراشه: پس از تثبیت لینکر GPTMS به پلی مر PDMS (شکل ۴)، انتهای اپوکسی لینکر به گروه آمین آنتی بادی متصل می شود. بنابراین آنتی بادی که از طریق گروه آمین به پلیمر متصل است می تواند از طریق مارکرهای موجود در سطح آگزوم به آن ها متصل شود. آنتی بادی مورد استفاده



شکل ۶ - نتایج تثبیت و مشاهده آگزوزم توسط آنتی بادی CD63 و CD151 (الف) و کنترل (ب)

سلولهای سرطانی می‌تواند طی فرایند متاستاز به بیرون از ریه گسترش یابد و کل بدن را درگیر سرطان کند. اصلی‌ترین علت مرگ در سرطان، تشخیص دیرهنگام می‌باشد، به عبارت دیگر هنگامی سرطان ریه تشخیص داده می‌شود که متاستاز اتفاق افتاده باشد و علت تشخیص دیرهنگام این نوع سرطان، تشابه علائم سرطان ریه و بیماری‌های ریوی، تهاجمی بودن روشهای تشخیص، نبود روشی که بتواند این نوع سرطان را در مراحل اولیه تشخیص دهد. آگزوزومها وزیکولهای حباب شکل اندوژنیک هستند که از جوانه زدن در تقسیم اندوزوم در طول بلوغ اندوزوم، از اندوزوم اولیه تا ثانویه به شکل، وزیکولهای چندتایی تشکیل میشوند. آگزوزومها از انواع مختلف پروتئینها تشکیل شده است مانند پروتئینهای اصلی سازگاری هیستولوژیک CD، اینتگرین، MHC-II، تتراسپانینها، پروتئین شوک حرارتی (Hsp)، پروتئین مرتبط با Ras (Rab) و غیره. حاوی انواع مختلف چربی، مانند اسفنگومیلین و کلسترول است. در نهایت، آگزوزومها حاوی اسید نوکلئیک هستند، از جمله mRNA، miRNA و ncRNA. آگزوزومها دیدگاه جدیدی را نسبت به زیست‌شناسی سرطان با هر دو مفاهیم تشخیصی و ارزیابی درمان ارائه می‌دهند. به دلیل ارتباط سلول به سلول، آگزوزومها پیشرفت، متاستاز، و اثر بخشی درمانی تومور را تحت تاثیر قرار می‌دهند. آنها را

بطور خلاصه، روشهای موجود تشخیص سرطان غالباً شامل بیوپسی بافت سرطانی و تکنیک‌های بر پایه پردازش تصاویر است. پژوهش جهت یافتن نشانگرهای غیر تهاجمی در مایعات بدن به منظور تشخیص تومور، یکی از زمینه‌های تحقیقاتی رو به رشد در تحقیقات سرطان است. یکی از این نشانگرهای موجود، آگزوزم‌های مترشح از سلولهای سرطانی می‌باشد. هدف ما از این مطالعه توسعه روشی مبتنی بر میکروفلوئیدیک تا بتوان آگزوزم‌های مترشح از سلولهای سرطانی را بتوان با استفاده از آنتی بادی بر علیه بیومارکرهای اختصاصی آگزوزمها در کانالهای میکروفلوئیدیک تثبیت کرد و با استفاده از رنگهای فلورسانس - کنژوگه شده با آنتی بادی زیر میکروسکوپ مشاهده کرد. نتایج نشان می‌دهد آگزوزمها بخوبی توانستند به اطراف کانالها (که در آن قسمت سرعت جریان کمتر بوده و فرصت اتصال بیشتر است) متصل شده و با آنتی بادی کنژوگه شده با FITC مشاهده گردد.

بحث

سرطان ریه به عنوان یکی از کشنده‌ترین نوع سرطان در جهان، سالانه میلیونها نفر از زنان و مردان را به کام می‌کشاند. مشخصه اصلی این نوع سرطان، رشد کنترل نشده سلولها در بافت ریه است. اگر این بیماری درمان نشود،

فرصت کافی جهت اتصال شیمیایی با PDMS را با بستر پیدا کرد. از آنجایی که هر مولکول آنتی بادی به یک مولکول FITC متصل شده است، هر چه شدت نور فلورسانس نشر شده (در محدوده سبز) بیشتر باشد نشان دهنده بیشتر بودن میزان آنتی بادی متصل شده و در نتیجه بیشتر بودن میزان آگروزم می باشد. در این تحقیق، روشی ساده، سریع و قابل تکرار در بستر میکروفلوئیدیک پایه گذاری شده که می تواند آگروزمهای مترشح از سلولهای سرطان ریه را تثبیت و آشکار کند.

در تحقیقات بعدی، نمونه های بیولوژیک (حاصل از سرم خون افراد بیمار) مورد بررسی قرار خواهد گرفت. با استفاده از دستگاه Nano Particle Tracking Analyzer "NTA" به نام آنالیز دریایی نانوذرات که به تازگی توسط دانشگاه زاهدان خریداری شده می توان تعداد آگروزم را در واحد حجم تعیین کرد. در اینصورت می توان تعداد مشخصی از آگروزم را داخل تراشه وارد کرده و تصاویر حاصل را با نرم افزار های پردازش آنالیز و با کنترل مقایسه کرد و بصورت کمی بیان کرد..

تشکر و قدردانی

بدینوسیله مولفین از صندوق حمایت از پژوهشگران (INSF) بخاطر گرنت شماره ۹۶۰۰۶۷۵۹ و دانشگاه تربیت مدرس بخاطر گرنت هسته پژوهشی IG-39708 تشکر می کنند.

می توان از خون و سایر مایعات بدن برای تعیین فرآیندهای بیماری که در بدن رخ می دهند، از جمله رشد سرطان، جدا سازی کرد. همچنانکه عنوان شد، آگروزمها همزمان با شروع سرطان در مایعات بدن افزایش می یابد و چنانکه بتوان با روشهای ساده آگروزمهایی که مارکرهای سرطانی را دارند بتوان در خون نشان داد می توان پی به وجود کانونی در سرطان برد که گام مهمی در تشخیص و درمان سرطان می باشد. مارکر CD63 مارکر آگرومی است که روی همه آگروزمها وجود دارد و مارکر CD151 مارکر سرطان ریه است که از سلولهای سرطانی نشات می گیرد و بر روی ۹۸٪ آگروزمها وجود دارد.

در این تحقیق، از بستر میکروفلوئیدیک (به عنوان روشی سریع، قابل کنترل، با مصرف بسیار کمتر مواد و نمونه) جهت تثبیت و آشکار سازی آگرومها مترشح از سلولهای سرطانی A549 به عنوان سلولهای اصلی سرطان ریه استفاده شد. استفاده از تراشه های میکروفلوئیدیک باعث افزایش سرعت و کاهش مصرف مواد شده و همچنین می توان تعداد کمتری آگروزم را نیز مشاهده کرد. این امر در اوایل سرطان که میزان آگروزم های حاوی مارکرهای سرطانی انتشار یافته بسیار کم است بسیار اهمیت دارد. جهت اتصال آنتی بادی بر روی بستر کانالهای میکروفلوئیدیک که از PDMS تشکیل شده از یک سیلان به نام (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTMS) استفاده شد. شبیه سازی کامسول به خوبی نشان داد، جریان در اشکال ذوزنقه ایی تعبیه شده در کانالهای میکروفلوئیدیک، به شدت کاهش یافت و سیلان

منابع

- 1- B. J. Berne, R. Pecora, *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*, Dover, 2000. [3] R. Pecora, *Dynamic Light Scattering*. Plenum, New York, 1985
- 2- Fang, S., et al., *Clinical application of a microfluidic chip for immunocapture and quantification of circulating exosomes to assist breast cancer diagnosis and molecular classification*. PloS one, 2017. **12**(4): p. 175050
- 3- Griffiths, S.G., Cormier M.T., Clayton A., *Differential proteome analysis of extracellular vesicles from lung cancer cell lines by chaperone affinity enrichment*. Proteomes 2017, **5**, 25
- 4- He, M., Crow J., Roth M., Zeng Y., Godwin AK. *Integrated immunoisilation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology*. Lab-on-a-chip 2014, **14**, 3773-3780

- 5- Keshavarz, E., Allahverdi, A., Sedghi, M., Naderi, A., Koohkan, F. and Naderi-Manesh, H., *Surface modification in microfluidic platform to miR-21 and miR-486 detection from lung cancer cell*. Cell and Molecular Research Journal: Accepted.
- 6- Lianidou, E. and C. Alix-Panabières, *Early detection of lung cancer based on DNA methylation analysis in sputum and plasma*. Translational Cancer Research, 2017. **6**(1): p. S51-S53
- 7- Raposo G., Stoovogel W., *Extracellular vesicle: exosomes, microvesicle, and friends*. J. Cell. Bio. 2013, 200, 373-383
- 8- Sandfeld-Paulsen, B., et al., *Exosomal proteins as diagnostic biomarkers in lung cancer*. Journal of Thoracic Oncology, 2016. **11**(10): p. 1701-1710.
- 9- Zhao, Z., Yang Y., Zeng Y., He M., *A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis*. Lab on a Chip, 2016. **16**(3): p. 489-496.
- 10- Webber J.P., Spary L.K., Sanders A.J., Chowdhury R., Jiang WC., Steadman R., Wymant J., Jones A.T., Kynaston H., Mason M.D. *Differentiation of tumor – promoting stromal myofibroblast by cancer exosomes*. Oncogene 2015. **34**, 290-302

Detection of Lung Cancer Cell Derived Exosomes in Microfluidic Platform via Immunofluorescence

Irani K., Kolahchi R., Sedghi M., Naderi-Manesh H. and Allahverdi A.*

Dept. of Nanobiotechnology/Biophysics, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Lung cancer is the most killer cancer in both men and female, as the lung cancer mortality rate is higher than death by the next two breast and prostate cancers. Lung cancer treatment compared to breast cancer is almost unsatisfied, since the most of lung cancer cases are diagnosed at a stage of the disease where metastasis has occurred. The cause of late diagnosis in lung cancer is the similarity of signs and symptoms of cancer with pulmonary symptoms and lack of confidence approaches to identify it at early stage. Nowadays, much attempt is paid to biomarkers such micro RNAs, exosomes, and tetraspanins that can give us information about intracellular events. Microfluidic science is the study of fluid behavior, and as technology is the construction and use of the specific properties in these dimension which is evolving and entering various fields, from chemical synthesis and biological analysis to optics and even information technology. In this work, we designed and fabricated via UV lithography a microfluidic chip for lung cancer cell derived exosomes capture followed by detection by CD63/CD151-FITC antibodies. The capture exosomes then extracted from microfluidic chip and investigated by Atomic Force Microscopy, AFM, and Dynamic Light Scattering DLS. The average size of exosomes was measured 19-37 nm by DLS and 35-37 nm by AFM that are similar to each other.

Key words: exosome, Lung cancer, early cancer diagnostic, microfluidic approach, CD 63/ CD 151 Anti bodies