

## آشکار سازی اگزوزم 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، اگزوزمها و تراسپانین‌ها 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 اگزوزم‌های مترشح از سلولهای سرطان ریه داخل چیپ میکروفلوئیدیک تثبیت شدند، سپس توسط آنتی بادی های CD63 و CD151 کنژوگه با FITC آشکار سازی شدند. اگزوزمهای تثبیت شده با این روش از چیپ استخراج و با میکروسکوپ نیروی اتمی و DLS مطالعه شدند. متوسط سایز اگزوزمها بدست آمده توسط DLS، ۱۹ تا ۳۷ نانومتر بود. متوسط سایز اگزوزمها 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، اگزوزوم، نشانگرهای مولکولی، آنتی بادی های CD 63 و CD151

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

### مقدمه

سرطان ریه یکی از شایعترین سرطان‌های 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 می‌باشند، به عبارت دیگر زمانی قادر به مشاهده تومور هستند که قطر تومور به یک سانتی متر رسیده باشد و در

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، اگزوزمها دو وظیفه بیولوژیکی را بر عهده دارند: حذف پروتین‌هایی که کارایی آنها به اتمام رسیده و دیگری انتقال بیومولکولهای ویژه بین

اختصاصی است. [۲]. Zhao و همکاران با استفاده از چیپ 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 پروتیین 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 بادی‌هایی که بر روی سطحش تثبیت می‌شود، آگزوزوم های موجود در محیط کشت و پلازما را به دام می‌اندازد و با نشانگرهای فلورسانس کنژوگه 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 جزئیات کم می شود و جریان حداقلی داخل اشکال دوزنقه ایی تعبیه شده برقرار می باشد. جهت شبیه سازی جریان داخل کانال از نرم افزار

سلولها از طریق مایعات بیولوژیکی نظیر خون و پلازما [۷]. مطالعات نشان داده که سلولهای سرطانی مقادیر بیشتری از وزیکولهای خارج سلولی آزاد می کنند که در فرایند تبدیل سلولهای غیر متاستازی 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 سولهای 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 ژنها می‌توان در تشخیص-های غیر تهاجمی و زود هنگام سرطان و همچنین نظارت بر روند درمان استفاده کرد.

در روشهای سنتی، جداسازی آگزوزومها با استفاده از اولتراسانتریفیوژ انجام می‌شود ولی این روش نمی‌تواند آگزوزومها را از سایر ساختارهای وزیکولی یا پروتیینهای بهم چسبیده تمایز دهد. روشهای دیگر مانند وسترن بلات و سنجش‌های 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 نمونه‌ی مصرفی، هزینه کم و زمان کارکرد کوتاه را به اثبات رسانده است. تکنیک‌های میکروفلوئیدیک که تا کنون برای جداسازی آگزوزومها استفاده شده است به دو دسته طبقه بندی می‌شوند: روش‌های جداسازی مبتنی بر اندازه وزیکولها و روش‌های جداسازی مبتنی بر بیومارکرهای سطحی.

استفاده از روش‌های ایمنی سنجی برای جداسازی آگزوزومها، از دیگر روشها مطمئن تر است زیرا در سایر روش‌های 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 اگزوزم 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 - اینشتین)، 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 اگزوزم از سلولهای سرطان ریه:** از رده سلولی A549 (لاین سلول سرطانی ریه) برای کشت سلولی استفاده گردید. دو روش پیشنهاد شده برای استخراج اگزوزم 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 اگزوزم 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 میکروفلوئیدیک:

سطحی PDMS جهت اتصال آنتی بادی باید بهینه و آماده شود. از آنجایی که پلیمر PDMS آب‌گریز است ابتدا باید توسط پلاسما گروهای هیدروفلیل OH- در سطح اولین مرحله، تثبیت لینکر Glycidylxypropyl trimethoxysilane (GPTMS) می‌باشد که بر روی سطح PDMS انجام گرفت. بدین منظور غلظت ۲٪ از لینکر در متانول را آماده کرده و در کانال میکروفلوئیدیک 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 آنتی بادی (CD63-FITC) فراهم می‌کنند. پس از مدت زمان مناسب، کانال میکروفلوئیدیک مورد نظر با متانول شست و شو داده و تحت گاز نیتروژن خشک گردید، سپس آنتی بادی اول (CD63-FITC) اضافه شد. غلظت مناسب آنتی بادی  $1/1000 \text{ mg.mL}^{-1}$  می‌باشد. این غلظت را تهیه کرده و به ورودی چپ ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی 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 آنتی 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 چپ کرده و حدود ۱ ساعت بدون حرکت اجازه داده می‌شود اتصال بین بیومارکر موجود در آگزوزوم و آنتی 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 آگزومی) وجود دارد. در

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

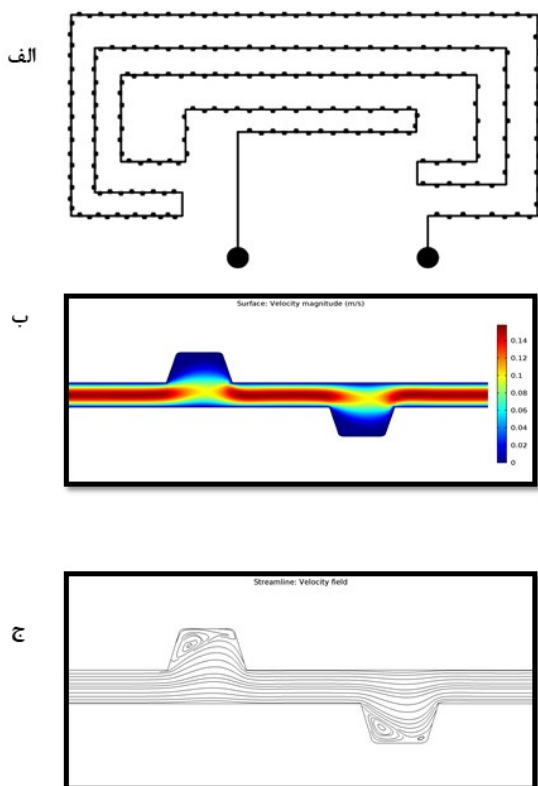
نشان دار کردن آگزوزوم: جهت اطمینان از وجود آگزوزوم مترشح از سلول سرطان ریه (A549) به آگزوزوم خالص بدست آمده از مرحله قبل، ۳ میکرولیتر از آنتی بادی با غلظت  $1/1000 \text{ mg.mL}^{-1}$  اختصاصی (CD151) کنژوگه با FITC، اضافه گردید. اتصال آنتی بادی با میکروسکوپ فورسانس Olympus IX81 تصویر برداری شد [۴].

#### 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 رویش 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 فازی 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 سایز آگزوزم:** پراکندگی دینامیکی نور یکی از روش‌های دقیق، سریع، تکرارپذیر و نسبتاً کم هزینه در اندازه گیری شعاع هیدرودینامیکی و سایر مشخصه‌های دینامیکی نانوذرات معلق در یک مایع است [۸]. سایز 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

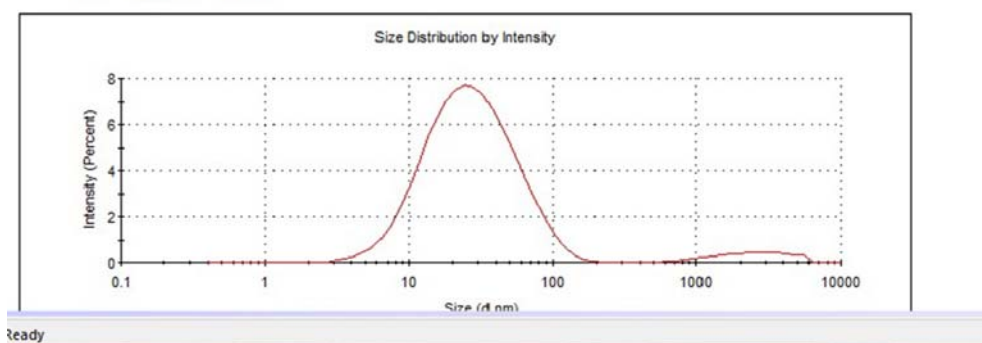
**الگوی طرح میکروفلویدیک:** الگوی طرح میکروفلویدیک بر مبنای سادگی جهت ساخت و دست ورزی است. بدین معنی که یک ورودی و یک خروجی داشته و جهت افزایش نسبت سطح به حجم اشکال دوزنقه ایی تعبیه شد تا سرعت جریان در این اشکال به حداقل رسیده و مناطق مرده (Dead zone) تشکیل گردد. این طرح میکروفلویدیک در مطالعه قبلی نیز 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 میکرومتر با خانه‌هایی دوزنقه شکل به صورت یک در میان، در چپ و راست کانال ایجاد شده است. فاصله هر دوزنقه از کناری ۱۵۰ میکرومتر می‌باشد. جریان

Sample Name: 1mM 1	Dispersant Name: Water
SOP Name: size.sop	Dispersant RI: 1/330
File Name: Irani.dts	Viscosity (cP): 0/8872
Record Number: 31	Measurement Date and Time: شنبه، ۰۲ مارس ۲۰۱۹ ۱۴:۲۷:۰۴ ب.ظ
Material RI: 1/33	
Material Absorbion: 0/333	

Temperature (°C): 25/0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 257/1	Measurement Position (mm): 4/65
Cell Description: Glass cuvette with square aperture	Attenuator: 8

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 22/48	Peak 1: 32/54	95/1	23/85
Pdl: 0/371	Peak 2: 2694	4/9	1377
Intercept: 0/925	Peak 3: 0/000	0/0	0/000
Result quality : Good			



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

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

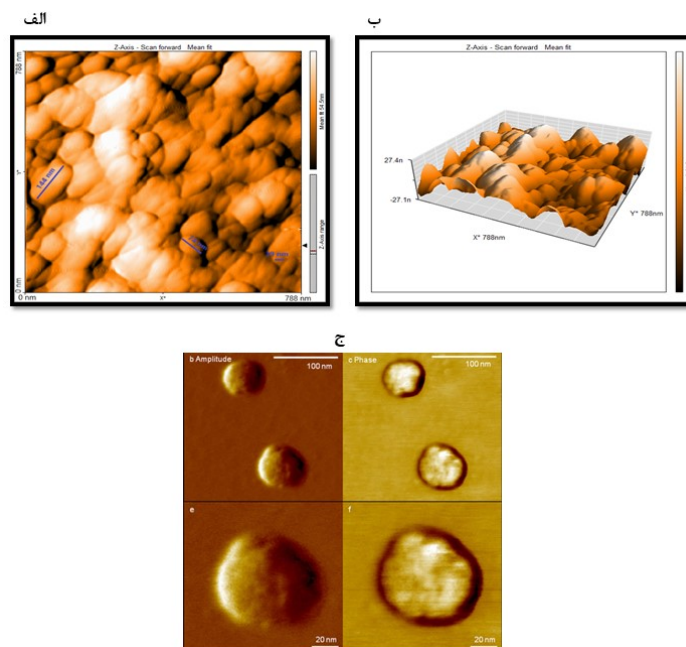
اطلاعات تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ نیروی اتمی به صورت خلاصه در جدول ۱ نمایش داده شده است:

جدول ۱ - مشخصات تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی

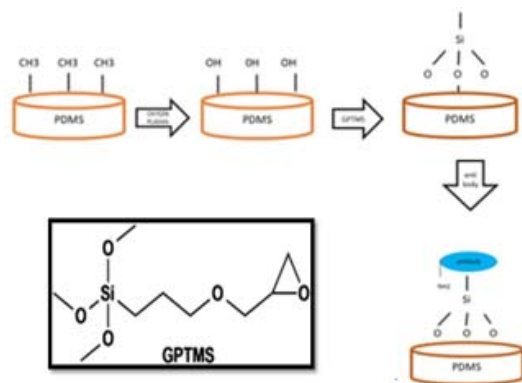
Image size	788 nm
Time/line	780 ms
Point/line	512
Set point	70%
Vibration freq.	160.086 kHz
Vibration ampl	500 mV
Operating mode	Non-contact
Cantilever type	Tap 190AI-G

همانطور که در شکل ۲ مشخص است بازه ی تغییرات سایز ذرات موجود در نمونه محدود بوده و پیک حدوداً 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 آگزوزوم های تثبیت شده بر روی لام ۳، ب- تصویر سه بعدی از آگزوزوم های تثبیت شده بر روی لام ۳، ج- سایز دقیق متوسط آگزوم ها



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

بررسی اتصال انتی بادی های CD63 و CD151 به آگزوزوم ها ی مترشح از سلولهای سرطان ریه: فلوروسانس یکی از روش های متداول در تصویر برداری زیست شناختی 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

تثبیت لینکر، انتی بادی در کانالهای میکروفلویدیک: در حالت طبیعی، سطح PDMS به علت گروه هیدروفوب  $\text{CH}_3$  تمایلی به اتصال به لینکر ندارد. اکسیداسیون سطح PDMS در فرایند پلازما برخی از گروه‌های متیل را حذف نموده و موجب ایجاد انتهای سیلانول ( $\text{SiOH}$ ) بر سطح آن شده و در حقیقت ستون PDMS حاوی گروه های 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 لینکر هایی از جنس سیلان نظیر GPTMS می‌کند. این ترکیبات از یک طرف با گروه های  $\text{OH}$ - ایجاد شده (توسط پلازما) در PDMS متصل می‌شود و از طرف دیگر با داشتن گروههای اپوکسی به گروههای  $\text{NH}_2$ - انتی بادیها متصل می‌شود. حلال اصلی سیلانها تولوئن می باشد. از آنجایی که تولوئن باعث خوردگی و نهایتا بسته شدن کانال‌های میکروفلویدیک می‌شود حلالهای مختلفی مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت متانول انتخاب شد. چگونگی این فرایند در شکل ۴ نشان داده شده است.

CD63 در کنار رنگ DPH به محیط حاوی آگزوزوم اضافه شد و در مرحله دوم ۱ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های مربوطه را به حدود ۷۰ میکرولیتر محیط اضافه شده و بلافاصله با میکروسکوپ فلورسانس مطالعه می‌گردد. شکل ۵ آگزوزوم‌ها در حضور آنتی‌بادی‌های نامبرده و همچنین بدون آنتی‌بادی به عنوان کنترل نشان داده شده است.

الف



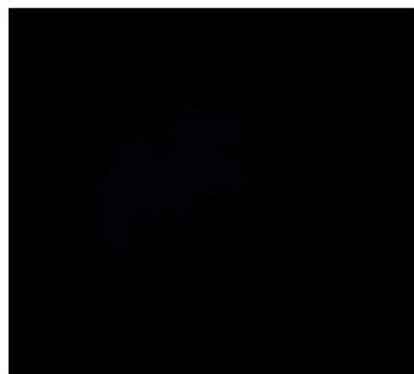
جذب و سپس آن را با طول موج بلندتری منتشر می‌کند. بنابراین نور متفرق شده از سطح سلول را می‌توان از نور تابیده شده به سلول تفکیک کرد.

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

ب



ج

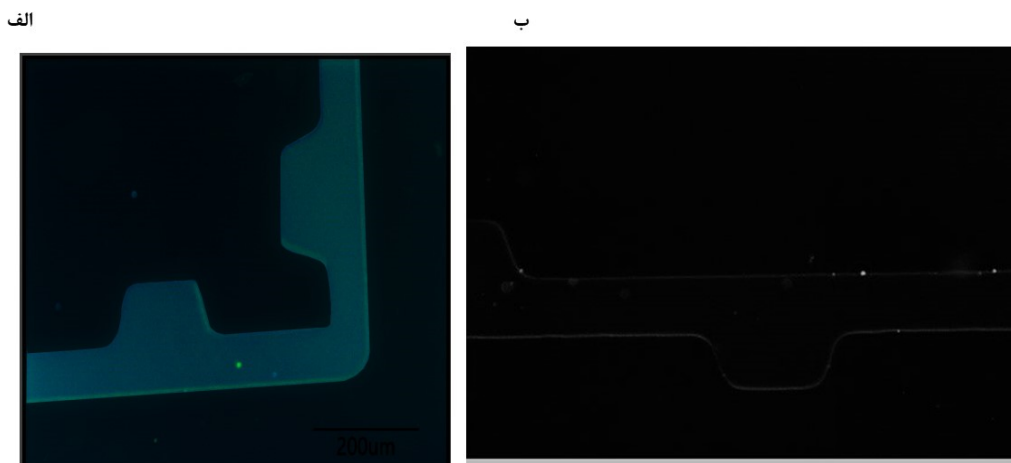


شکل ۵ - نتایج اتصال آنتی‌بادی CD 63 و DPH (الف)، CD151 (ب) و کنترل بدون آنتی‌بادی (ج) به آگزوزوم‌های مترشح شده از سلولهای A549 سرطان ریه

دارای نشانگر FITC می‌باشد که در حضور نور UV به رنگ سبز دیده می‌شود. فرآیند میکروفلوئیدیک بر طبق پرتوکل انجام گردید و تصاویر زیر بیانگر اتصال آگزوزوم با آنتی‌بادی‌ها در داخل تراشه است که با میکروسکوپ فلورسنت تصویربرداری شده است: (شکل ۶)

تثبیت و آشکار سازی آگزوزوم‌ها در کانال‌های تراشه: پس از تثبیت لینکر GPTMS به پلی‌مر PDMS (شکل ۴)، انتهای اپوکسی لینکر به گروه آمین آنتی‌بادی متصل می‌شود. بنابراین آنتی‌بادی که از طریق گروه آمین به پلیمر متصل است می‌تواند از طریق مارکرهای موجود در سطح آگزوزوم به آن‌ها متصل شود. آنتی‌بادی 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 هیسٹولوژیک CD، اینتگرین، MHC-II، تتراسپانینها، پروتئین شوک حرارتی (Hsp)، پروتئین مرتبط با (Rab) Ras و غیره. حاوی انواع مختلف چربی، مانند اسفنگومیلین و کلسترول است. در نهایت، آگزوزومها حاوی اسید نوکلئیک هستند، از جمله mRNA، miRNA و lncRNA. 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، آگزوزومهای مترشح از سلولهای سرطانی می‌باشد. هدف ما از این مطالعه توسعه روشی مبتنی بر میکروفلویدیک تا بتوان آگزوزومهای مترشح از سلولهای سرطانی را بتوان با استفاده از آنتی بادی بر علیه بیومارکرهای اختصاصی آگزوزومها در کانالهای میکروفلویدیک تثبیت کرد و با استفاده از رنگهای فلورسانس - کژوگه شده با آنتی بادی زیر میکروسکوپ مشاهده کرد. نتایج نشان می‌دهد آگزوزومها بخوبی توانستند به اطراف کانالها (که در آن قسمت سرعت جریان کمتر بوده و فرصت اتصال بیشتر است) متصل شده و با آنتی بادی کژوگه 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 آگروزمها 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 دوزنقه 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 immunosilation 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 as 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