

## تشخیص پروتئین واکنش دهنده C (CRP) و فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا ( $TNF-\alpha$ ) بر پایه طیف سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی از بستر سیلیکون متخلخل

شیما محمدی<sup>۱</sup>، فرشته رحیمی<sup>۱\*</sup>، علی حسین رضایان<sup>۱</sup>، علی ابویی مهریزی<sup>۲</sup> و مهسا صدیقی<sup>۳</sup>

۱- بخش نانویوتکنولوژی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- بخش مهندسی پزشکی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۴- گروه فارماسیوتیکس و نانوفناوری، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۷/۲ - دریافت نسخه نهایی: ۱۴۰۱/۱۰/۲۸)

**چکیده**- سنجش یکی از علل اصلی مرگ و میر در بخش مراقبت های ویژه در سراسر جهان است. تشخیص زودهنگام و دقیق نشانگرهای زیستی مرتبط با سپسیس در جلوگیری از پیشرفت بیماری و کاهش مرگ، یک نیاز حیاتی است. در این مقاله، از یک حسگر زیستی نوری بدون برچسب بر پایه طیف سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی در بستر سیلیکون متخلخل، برای اندازه گیری پروتئین واکنش دهنده C (CRP) و فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا ( $TNF-\alpha$ ) به عنوان نشانگرهای زیستی شایع سپسیس استفاده شد. سطح لایه سیلیکون متخلخل با اندازه حفرات در بازه ۵ تا ۵۰ نانومتری و تخلخل ۷۰ درصدی به منظور اتصال زیستی کووالانسی آبتامر، توسط ۳- آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان (APTES) و گلو تار آلدهید (GA) اصلاح شیمیایی شد تا توانایی به دام انداختن آنالیت هدف را به دست آورد. با بررسی پرتو بازتاب شده از لایه متخلخل و طیف سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی می توان ضریب شکست لایه متخلخل را محاسبه کرد که با تغییرات میزان حضور غلظت های مختلف نشانگرهای زیستی تغییر می کند. نتایج آزمایش ها رفتار خطی در غلظت های ۱۰ تا ۱۰۰۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر در پروتئین واکنش دهنده C و در غلظت های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر در فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا و همچنین انتخاب پذیری این حسگر زیستی را نشان داد که پتانسیل بسیار بالایی برای توسعه در زمینه تشخیص بالینی سپسیس را ارائه می دهد.

**واژه های کلیدی:** سپسیس، طیف سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی، سیلیکون متخلخل، پروتئین واکنش دهنده C، فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا.

## CRP and $TNF-\alpha$ Detection using Porous Silicon Substrate Based on Reflectometric Interference Fourier Transform Spectroscopy

\*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rahimi.f@ut.ac.ir

Sh. Mohammadi<sup>1</sup>, F. Rahimi<sup>1</sup>, A.H. Rezayan<sup>1</sup>, A. Abouei Mehrizi<sup>2</sup> and M. Sedighi<sup>3,4\*</sup>

<sup>1</sup> Nanobiotechnology Division, Department of Life Sciences Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Biomedical Engineering Division, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technology, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

<sup>4</sup> Department of Nanomedicine, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

### ABSTRACT

Sepsis is one of the leading causes of death in intensive care units (ICU) and is becoming more prevalent globally. As a result, an accurate and timely diagnosis of sepsis is critical for selecting the best treatment to prevent disease progression and mortality. In this study, CRP and TNF- $\alpha$  as common biomarkers of sepsis were detected using a label-free optical biosensor based on interferometric Fourier transform spectroscopy from a porous silicon substrate. The porous silicon layer was chemically modified with APTES and glutaraldehyde to immobilize the aptamer covalently in order to capture the analyte. The refractive index of the porous layer was determined by analyzing the reflection spectrum from the porous layer, which was associated with different biomarker concentrations. The results demonstrated linear responses in concentrations ranging from 10-10000 ng/ml for CRP and 100-10000 ng/ml for TNF- $\alpha$  and the biosensor's high discrimination. Thus, it has a high potential for advancement in clinical sepsis diagnosis.

**Keywords:** Sepsis, Reflectometric interference Fourier transform spectroscopy (RIFTS), Porous Silicon, CRP, TNF- $\alpha$ .

### ۱- مقدمه

پاسخ ایمنی سریع به عفونت‌ها شناخته شده است (۱ و ۵). درواقع این نشانگرهای می‌توانند جهت تشخیص مطمئن و زودهنگام مورد استفاده قرار گیرند. حد تشخیص بالینی که نشان‌دهنده مقادیر پروتئین‌های سرمی برای تمایز افراد بیمار و سالم برای پروتئین واکنش‌دهنده C و فاکتور نکروز توموری آلفا به ترتیب ۱۰ میکروگرم بی میلی‌لیتر و ۱۷ پیکوگرم بر میلی‌لیتر است (۶).

اگرچه به دلیل اقدامات پیشگیرانه‌ای که در بیمارستان‌ها انجام می‌شود مرگ‌ومیر کلی کاهش می‌یابد، اما همچنان سرعت بروز سپسیس، نشان‌دهنده چالشی دنباله‌دار است (۳). تشخیص عفونت در بیماران بر اساس نشانه‌های بالینی برای تشخیص زودهنگام، بسیار سخت است زیرا علائم اولیه سپسیس غیراختصاصی است. از طرف دیگر، هر ساعت تأخیر در تشخیص سپسیس و درمان مؤثر آنتی‌بیوتیکی، باعث کاهش ۷/۶ درصدی نرخ بقای فرد بیمار می‌شود (۷ و ۸). روش‌های معمول تشخیص آزمایشگاهی بر اساس تعیین گونه باکتری بیماری‌زا و سنجش نشانگرهای زیستی خونی است که نیازمند مراحل متعدد، زمان و هزینه زیاد، کارکنان ماهر هستند و یا از حساسیت کافی برای تشخیص نمونه‌هایی با عفونت کم

سپسیس، پاسخ شدید یا ضعیف التهابی سراسری و گسترده بدن در مواجهه با عوامل بیماری‌زای مهاجم به صورت مستقیم یا غیرمستقیم است. درواقع سندرم مختل‌کننده چندین اندام به واسطه فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی است که در نهایت منجر به سپسیس حاد و شوک سپتیک می‌شود (۳-۱). داده‌های جمع‌آوری شده از بخش مراقبت‌های ویژه ۷۵ کشور نشان می‌دهد که ۶۲ درصد از نمونه‌های مثبت جدا شده باکتری‌های گرم منفی، ۴۷ درصد باکتری‌های گرم مثبت و ۱۹ درصد قارچ هستند (۴). عوامل بیماری‌زای مهاجم، سلول‌های ایمنی را فعال و سیتوکاین‌ها را آزاد می‌کنند. برخی از ترکیبات بیماری‌زا با گیرنده‌های شبه تال<sup>۱</sup> (TLRs) که روی سطح مونسیت‌ها قرار دارند برهمکنش می‌دهند و با فعال‌سازی فاکتور رونویسی کننده NF-KB، باعث رهایش سیتوکاین‌های پیش التهابی مانند اینترلوکین-۱ بتا<sup>۲</sup> (IL-1 $\beta$ )، اینترلوکین-۶<sup>۳</sup> (IL-6) و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا<sup>۴</sup> (TNF- $\alpha$ ) می‌شوند که نشان‌دهنده سپسیس اولیه است. اینترلوکین-۶ باعث تحریک کبد به تولید پروتئین واکنش‌دهنده C<sup>۵</sup> (CRP) می‌شود که یک گروه از پروتئین‌های واکنش‌دهنده فاز حاد بوده که به عنوان بخشی از

متخلخل کار می‌کند (۲۰ و ۲۱). برای رسیدن به این هدف، سطح سیلیکون متخلخل پس از ساخت، اصلاح سطح شد و اتصال کووالانسی آپتامر آمین‌دار و اختصاصی نشان‌گرهای زیستی پروتئین واکنش دهنده C و فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا روی آن‌ها انجام گرفت. سپس غلظت‌های مختلف هر یک از نشان‌گرهای زیستی بر روی نانوحسگر موردسنجش قرار گرفت. در شکل (۱) به صورت خلاصه و شماتیک تجهیزات لازم برای روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی، طیف بازتابی و نمودار تبدیل فوریه سریع از سطح سیلیکون متخلخل آورده شده است.

## ۲- مواد و روش تحقیق

### ۲-۱- ساخت لایه سیلیکون متخلخل

در این تحقیق از ویفر سیلیکون با آلایدگی نوع  $P^+$  با برش (۱۰۰) و مقاومت ویژه  $0.009 - 0.001$  اهم سانتی‌متر به ضخامت  $525 \pm 25$  میکرومتر استفاده شد که از شرکت لتج<sup>۹</sup> سنگاپور خریداری و به مربع‌هایی با ابعاد  $8 \times 8$  میلی‌متر مربع برش زده شد. در ابتدا، این قطعات با صابون و آب دیونیزه شسته و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اتانول غوطه‌ور شده و در دستگاه فراصوت در معرض امواج فراصوت قرار گرفتند. در نهایت نمونه‌ها پس از شستشو با آب دیونیزه، خشک شدند. به منظور انجام فرآیند خوردگی الکتروشیمیایی، قطعات در داخل محفظه تفلونی در مجاورت محلول الکترولیت با نسبت حجمی یک به سه (۱:۳) حاوی اسید هیدروفلوریک (۳۸-۴۰ درصد، مرک آلمان): اتانول (۹۷ درصد، مرک آلمان) و چگالی جریان ثابت ۱۶۰ میلی‌آمپر بر سانتی‌متر مربع قرار گرفتند. به علت تشکیل لایه مزاحم<sup>۱۰</sup> که اندازه منافذ سطح کوچک‌تر از اندازه مطلوب است (۱۷، ۱۹ و ۲۰)، لایه اولیه به مدت ۳۰ ثانیه ساخته و سپس با قرار گرفتن در معرض محلول سدیم هیدروکسید یک مولار در حمام فراصوت به مدت پنج دقیقه تخریب شد. در مرحله بعد پس از شستشوی قطعه با آب دیونیزه، ساخت لایه اصلی به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. در

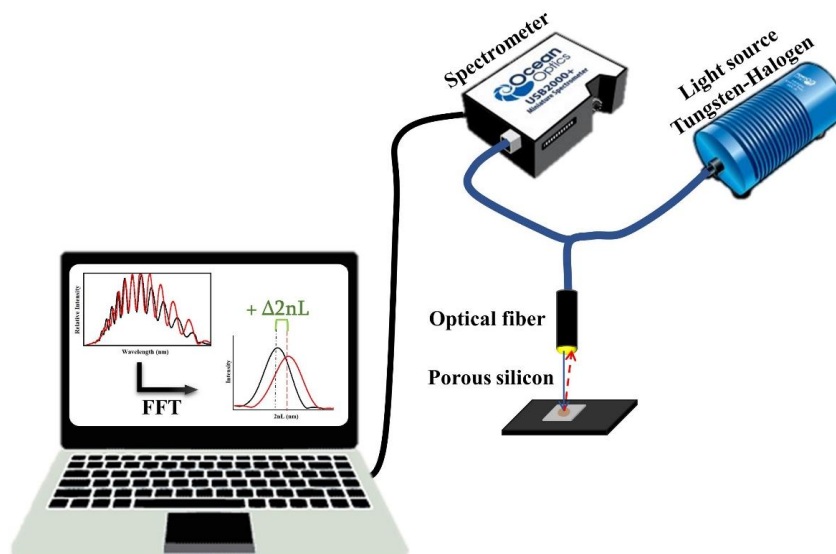
برخوردار نیستند (۹ و ۱۰)؛ بنابراین، یک روش سریع و حساس برای تشخیص سپیس در مراحل اولیه جهت تجویز سریع آنتی‌بیوتیک‌های مناسب، جلوگیری از تشدید بیماری و در نتیجه نجات جان انسان‌ها ضروری است.

در سال‌های اخیر، همگام با روش‌های رایج نوری مانند فلورسانس و رزونانس پلاسمون سطحی<sup>۶</sup> (SPR)، سیلیکون متخلخل به علت مساحت سطحی زیاد، شیمی سطح آسان، روش ساخت ساده و زیست سازگاری در میان سامانه‌های نوری بدون برچسب بسیار موردتوجه قرار گرفته است (۱۱). یکی از این روش‌های بدون برچسب، طیف‌سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی<sup>۷</sup> (RIFTS) است که طیف بازتاب نور در ناحیه مرئی و فروسرخ را از یک لایه نازک اندازه‌گیری می‌کند. سپس تبدیل فوریه این طیف محاسبه می‌شود. در منحنی تبدیل فوریه، قله‌ای ظاهر می‌شود که مکان آن ضخامت نوری مؤثر (EOT)<sup>۸</sup> لایه است و توسط مقدار زیر تعریف می‌شود (۱۲):

$$EOT = 2nL \quad (1)$$

که در رابطه فوق،  $n$ ، ضریب شکست و  $L$ ، ضخامت لایه هستند. حال اگر لایه مورد بررسی در این روش، لایه متخلخلی مانند سیلیکون متخلخل باشد، ورود مولکول زیستی به درون حفرات و به دام افتادن آن‌ها توسط مولکول‌های کاوشگر، سبب تغییر در ضریب شکست لایه و در نتیجه ضخامت نوری مؤثر لایه شده و می‌توان از آن به عنوان پاسخ حسگر زیستی استفاده کرد (۱۲-۱۴). چنین حسگرهای زیستی‌ای به علت حساسیت و پایداری بالا، امکان سنجش زیستی بسیار پایدار و قابل اعتمادی را برای هدف‌های پروتئینی، باکتریایی و DNA فراهم می‌کنند (۱۵-۱۹).

استفاده از آپتامر به عنوان گیرنده‌های زیستی، حسگرهای بر پایه آپتامر یا آپتاسگرها را تشکیل می‌دهند. هدف از این تحقیق، طراحی و ساخت آپتاسگر نوری حساس و بدون برچسب جهت اندازه‌گیری نشان‌گرهای زیستی پروتئین واکنش دهنده C و فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا است که بر اساس طیف‌سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی از بستر سیلیکون



شکل ۱- تجهیزات لازم برای روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی طیف بازتابی و نمودار تبدیل فوریه سریع از سطح سیلیکون متخلخل.

آپتامر DNA آمین‌دار CRP - NH<sub>2</sub> (5'-  
ACACGATGGGGGGTATGATTGATGTGGTTGT  
TGCATGATCGTGG-3') (۴۶ مر) و آپتامر DNA آمین دار  
TNF- $\alpha$  - NH<sub>2</sub> (5'-  
TGGTGGATGGCGCAGTCGGCGACAA-3') (۲۵ مر)

سنتز و با روش فاز معکوس (BIO-RP) خالص شدند. هر آپتامر با غلظت ۳۰ میکرومولار روی سطح فعال شده هر نمونه، به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس سطح نمونه‌ها توسط بافر فسفات نمکی<sup>۱۴</sup> شسته و خشک شدند. برای اندازه‌گیری نشان‌گرهای زیستی سپسیس، آپتاسگرهای حاصل به‌صورت جداگانه در معرض غلظت‌های مختلف (۱۰-۰/۰۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از پروتئین واکنش دهنده C انسانی (سیگما آلمان) و فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا انسانی (پروسپس آلمان) به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. در انتها نمونه‌ها با بافر شسته و خشک شدند.

### ۲-۳- مشخصه‌یابی لایه سیلیکون متخلخل

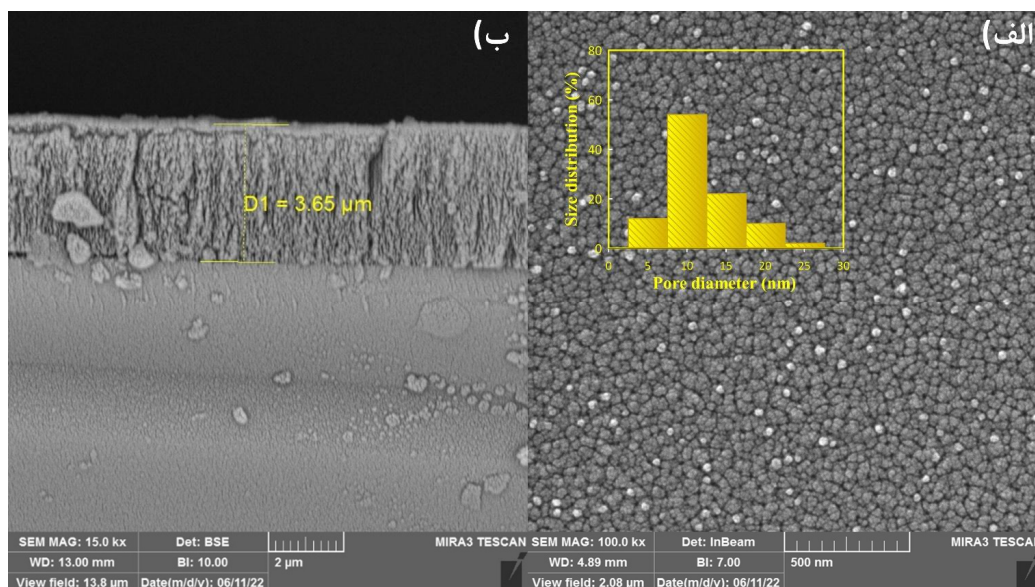
بررسی ساختار، اندازه حفرات و مورفولوژی سطح لایه متخلخل بعد از سنتز اولیه به‌صورت سطحی و مقطعی توسط

نهایت نمونه سیلیکون متخلخل با استفاده از اتانول و گاز نیتروژن خشک شد.

### ۲-۲- اصلاح سطح سیلیکون متخلخل

به‌منظور افزایش پایداری لایه به‌تازگی متخلخل شده در برابر عوامل محیطی، ابتدا اکسیداسیون گرمایی سطح به مدت یک ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و سپس اکسیداسیون شیمیایی با غوطه‌ور شدن در محلول هیدروژن پراکساید (۳۵ درصد، مرک آلمان) در تاریکی، دمای اتاق و به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. برای عامل‌دسازی و فعال شدن سطح، نمونه‌ها در محلول اتانولی ۵ درصد آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان (APTES)<sup>۱۱</sup> (۹۸ درصد، مرک آلمان) به مدت یک ساعت غوطه‌ور شده و پس از شستشو با اتانول، خشک شدند. در مرحله بعد، سطح نمونه‌ها در معرض محلول ۲/۵ درصد گلوتارآلدئید (GA)<sup>۱۲</sup> (۲۵ درصد، مرک آلمان) در بافر هپس (HEPES)<sup>۱۳</sup> (pH=۷/۴) به مدت یک ساعت قرار گرفتند و پس از شستشو با بافر فسفات نمکی (PBS)<sup>۱۴</sup> (pH=۷/۴)، از طریق گاز نیتروژن خشک شدند.

به‌منظور اتصال زیستی گیرنده زیستی روی سطح فعال شده،



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی از نمای (الف) سطح (تصویر داخلی آنالیز توزیع اندازه ذرات) و (ب) مقطع سیلیکون متخلخل.

لامپ و کاهش حساسیت آشکارساز است. در هر مرحله از سنتز و اصلاح سطح، طیف تداخل بازتابی با استفاده از نرم افزار IGOR (ویومتریکس آمریکا) به منحنی فوریه تبدیل شد. در راستای این تبدیل، محل پیک حاصل نشان دهنده ضخامت نوری مؤثر است. درصد تخلخل، ضریب شکست و ضخامت لایه متخلخل از روش طیفسنجی نفوذ مایع<sup>۱۷</sup> (SLIM) با استفاده از بازتاب سنجی تداخلی سطح لایه متخلخل در دو محیط مختلف (هوا و متانول) محاسبه شد (۲۰-۱۵).

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- مشخصه یابی

مشخصه یابی انجام شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی در شکل (۲) نشان می دهد که ابعاد حفرات ۵ تا ۵۰ نانومتر بوده است. همچنین، میزان تخلخل  $70/91 \pm 2/68$  درصد، ضخامت لایه  $1/36 \pm 3/67$  میکرومتر و ضریب شکست  $1/39 \pm 0/4$  توسط روش طیفسنجی نفوذ مایع برای سه نمونه محاسبه شد که ضخامت به دست آمده با داده های حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی

میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی<sup>۱۵</sup> (FE-SEM) (MIRA3, TESCAN) انجام شد. برای استخراج توزیع اندازه حفرات از نرم افزار ImageJ استفاده شد. ترکیبات شیمیایی و گروه های عاملی سطحی با استفاده از طیفسنجی تبدیل فوریه مادون قرمز به روش بازتابندگی کلی تضعیف شده<sup>۱۶</sup> (ATR-FTIR) (تسنور ۲۷ آمریکا) مورد آنالیز قرار گرفتند که طیف حاصل به طور میانگین از ۱۶ اسکن با وضوح چهار سانتیمتر معکوس در بازه عدد موج ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ سانتیمتر معکوس به دست آمده است.

#### ۲-۴- طیفسنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی و بررسی

##### پاسخ حسگر زیستی

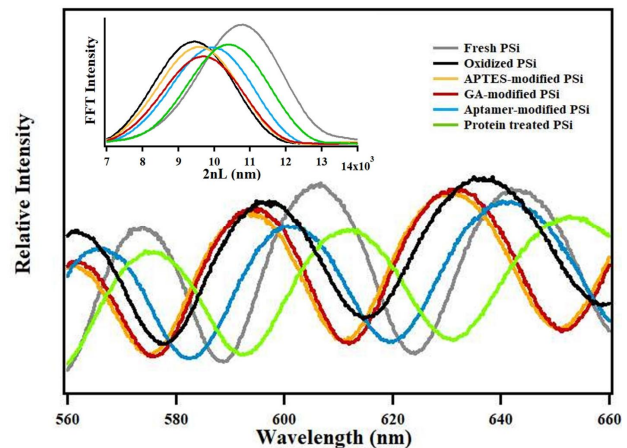
پرتو خروجی از لامپ هالوژن- تنگستن پس از متمرکز شدن توسط فیبر نوری به صورت عمود روی سطح نمونه تابیده شده و پرتو بازتاب شده از نمونه به طیفسنج USB400 (اوشن اپتیک آمریکا) منتقل شد. پرتو بازتابی در بازه ۴۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر با وضوح طیفی ۵/۰ نانومتر هر ۱۰ میلی ثانیه ثبت شد. افت طیف در خارج از بازه سنسجش، به دلیل کاهش در شدت

همچنین اتصال آپتامر، این کمیت را به مقدار  $92/09 \pm 0/9$  میکرومتر افزایش می دهد.

روش دیگر جهت بررسی تغییرات حاصل از اصلاح سطح و شناسایی گروه های عاملی موجود در سطح، استفاده از طیف سنجی بازتابندگی کلی تضعیف شده است که در شکل (۴) قابل مشاهده است. از آنجایی که سطح سیلیکون متخلخل تازه سنتز شده، غنی از گروه های هیدریدی است که به شدت واکنش پذیر، ناپایدار و مستعد اکسیداسیون یا هیدرولیز در شرایط محیطی است که منجر به تغییر ویژگی های فیزیکوشیمیایی و نوری در طی گذر زمان است که موجب اتصال ناپایدار عناصر تشخیص زیستی می شود، پس غیر فعال-سازی سطح به صورت حرارتی و شیمیایی ضروری است (۱۷).

پس از اکسیداسیون، قله های متناسب به پیوند Si-O-Si در  $1000$  تا  $1200$  سانتیمتر معکوس و پیوند  $O_nSiH_x$  پایین تر از  $1000$  سانتیمتر معکوس ظاهر می شوند که نشان دهنده اکسیداسیون موفق است. در مرحله بعدی اتصال زیستی پروتئین روی سطح اصلاح شده با ظهور پیک های مربوط به کشش متقارن و نامتقارن C-H به ترتیب در ناحیه  $2923$  سانتیمتر معکوس و  $2846$  سانتیمتر معکوس و همچنین ارتعاشات کششی CO در ناحیه  $1155$  سانتیمتر معکوس، ارتعاشات کششی COO در  $1400$  سانتیمتر معکوس تأیید شد. در نهایت اتصال موفق پروتئین با دو پیک متناسب به باندهای آمید I و آمید II به ترتیب در  $1651$  سانتیمتر معکوس و  $1545$  سانتیمتر معکوس نشان داده شد. تمامی این نتایج تجربی با داده های حاصل از اصلاح سطح و تثبیت پروتئین روی سیلیکون متخلخل مطابقت دارد (۱۱، ۱۷ و ۲۱ و ۲۲).

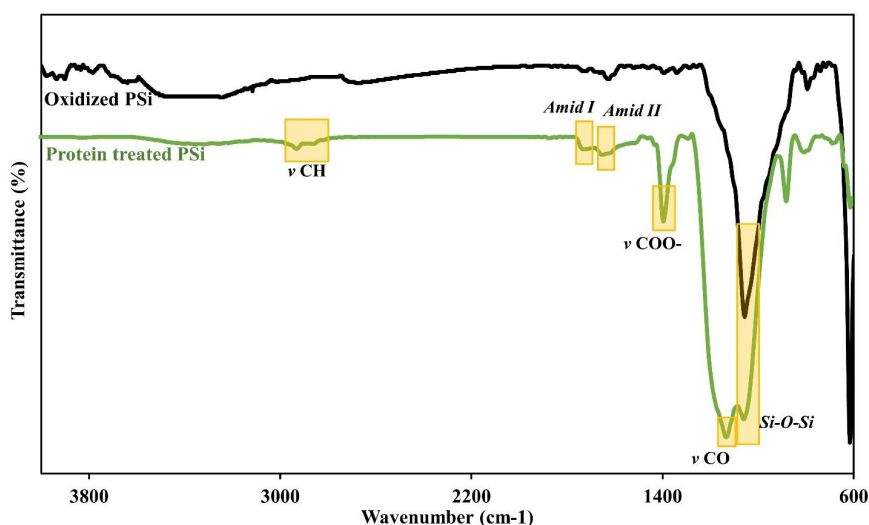
تکرارپذیری<sup>۱۸</sup> به انحراف استاندارد و تولیدپذیری<sup>۱۹</sup> به ثبات اندازه گیری های متعدد در شرایط مختلف اشاره دارد. تکرارپذیری در فرآیند سنتز به صورت خوانش نقطه مرکزی منطقه متخلخل شده سیلیکون حاصل از چهار بار سنتز، بررسی شد. بر اساس طیف سنجی نفوذ مایع، درصد تخلخل و ضریب شکست به ترتیب  $91 \pm 2/68$ ،  $70$  و  $1/39 \pm 0/04$  درصد است.



شکل ۳- بررسی لایه سیلیکون متخلخل پس از ساخت و پس از هر مرحله اصلاح سطح و همچنین اتصال زیستی نشانگر زیستی با روش طیف سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی.

(شکل ۲- ب) که  $3/65$  میکرومتر اندازه گیری شده است، مطابقت دارد. همچنین توزیع اندازه حفرات توسط نرم افزار ImageJ انجام شد که ابعادی در حدود  $5$  تا  $50$  نانومتر را برای حفرات نشان می دهد (شکل داخلی ۲- الف). برآزش این نمودار با یک تابع گاوسی شکل، بیشینه  $10$  نانومتر را نشان می دهد.

جهت بررسی و تأیید هر مرحله از ساخت و اصلاح سطح، از روش طیف سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی استفاده شد؛ زیرا هرگونه تغییرات و شیمی سطح حفرات مستقیماً روی ضریب شکست و EOT اثر می گذارد. شکل (۳) نشان دهنده طیف بازتابی حاصل از نمونه سیلیکون متخلخل بعد از مرحله ایجاد تخلخل و سپس هر مرحله از اصلاح سطح است. در مرحله اکسیداسیون، کاهش EOT از  $10/0 \pm 59/50$  میکرومتر تا  $9/0 \pm 46/54$  میکرومتر نمایانگر تشکیل لایه نازکی از  $SiO_2$  روی سطح حفرات و کاهش ضریب شکست نسبت به اسکلت سیلیکونی است. در مراحل بعدی اصلاح سطح توسط ۳- آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان و گلو تار آلدهید، این کمیت به مقدار به ترتیب  $56/48 \pm 0/9$  میکرومتر و  $67/46 \pm 0/9$  میکرومتر می رسد که نشان دهنده افزایش EOT به علت افزایش ضریب شکست و به علت شکل گیری لایه ارگانو-سیلان است.



شکل ۴- شناسایی گروه‌های عاملی سطح با استفاده از طیف‌سنجی بازتابندگی کلی تضعیف‌شده.

آنالیت هدف هستند.

$$\text{تغییرات محل قله} = \frac{EOT_1 - EOT_0}{EOT_0} \quad (2)$$

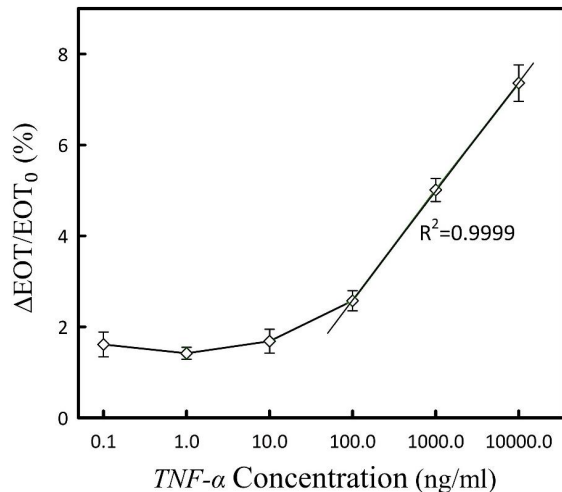
افزایش ضریب شکست در نتیجه افزایش EOT لایه نازک قابل مشاهده است که نشان دهنده توانایی نفوذ مولکول‌ها به داخل حفرات و اتصال به آپتامر اتصال زیستی یافته روی سطح اصلاح شده است.

پروتئین واکنش دهنده C یک پروتئین فاز حاد (۱۲۰ کیلو دالتون) و متعلق به خانواده پپتیدازهاست که توسط کبد در پاسخ متصل به لیگاند وابسته به کلسیم است که توسط کبد در پاسخ به التهاب یا آسیب بافتی تولید می‌شود. محرک اولیه تولید آن IL-6 است. سطح پروتئین واکنش دهنده C با نیمه عمر ۱۹ ساعته، طی چهار تا شش ساعت پس از تحریک افزایش می‌یابد، هر هشت ساعت دو برابر می‌شود و طی ۳۶ تا ۵۰ ساعت مقدار آن به حداکثر می‌رسد. پروتئین واکنش دهنده C به‌عنوان نشانگر زیستی است که به‌طور گسترده به‌عنوان نشانگر عفونت و سپسیس استفاده می‌شود (۲۳). شکل (۵) نمودار تغییرات EOT<sub>0</sub> برحسب غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰۰۰ نانوگرم بر میلی-لیتر یا ۸۳/۳۳ نانومولار - ۸۳/۳۳ پیکومولار از پروتئین واکنش دهنده C به‌صورت خطی است.

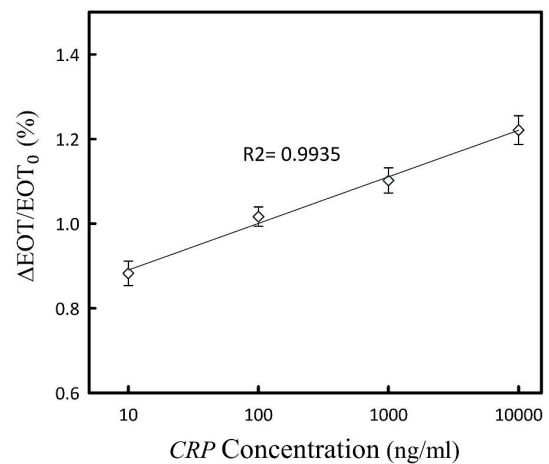
علاوه بر این، تولیدپذیری آپتاسنگر با بررسی EOT حاصل از طیف‌سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی قبل و بعد از اتصال آپتامرهای مختلف، به ترتیب ۹۶۵۵/۰۸±۰/۵۴ نانومتر و ۱۰۴۰۳/۵۱±۲/۲۱ نانومتر محاسبه شد؛ بنابراین، انحراف استاندارد کمتر از سه درصد نشان می‌دهد که نوساختارهای سیلیکون متخلخل یکنواخت هستند و انحراف مشاهده‌شده ناشی از واکنش آنودیزاسیون و همچنین تنظیم دستی موقعیت اندازه‌گیری بازتاب از نقطه مرکزی است.

### ۳-۲- عملکرد آپتاسنگر

توانایی ردیابی حسگر زیستی با قرار دادن ناحیه سنجش در معرض غلظت‌های مختلف دو نشانگر زیستی پروتئین واکنش دهنده C و فاکتور نکروز دهنده توموری با اندازه‌های ۱۲۰ و ۱۷ کیلو دالتون مورد بررسی قرار گرفت. طیف تبدیل فوریه تداخل بازتابی از پروتئین واکنش دهنده C شکل (۵) با غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و پروتئین فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا شکل (۶) با غلظت‌های ۰/۱ تا ۱۰۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر است که پاسخ حسگر زیستی با استفاده از تساوی (۲) محاسبه شد که در آن، A1 و A2 به ترتیب ضخامت نوری مؤثر لایه متخلخل قبل و بعد از حضور



شكل ۶- پاسخ زیست حسگر اصلاح شده با آبتامر فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا به صورت نسبت تغییرات ضخامت نوری مؤثر لایه بر حسب غلظت های مختلف از پروتئین فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا.



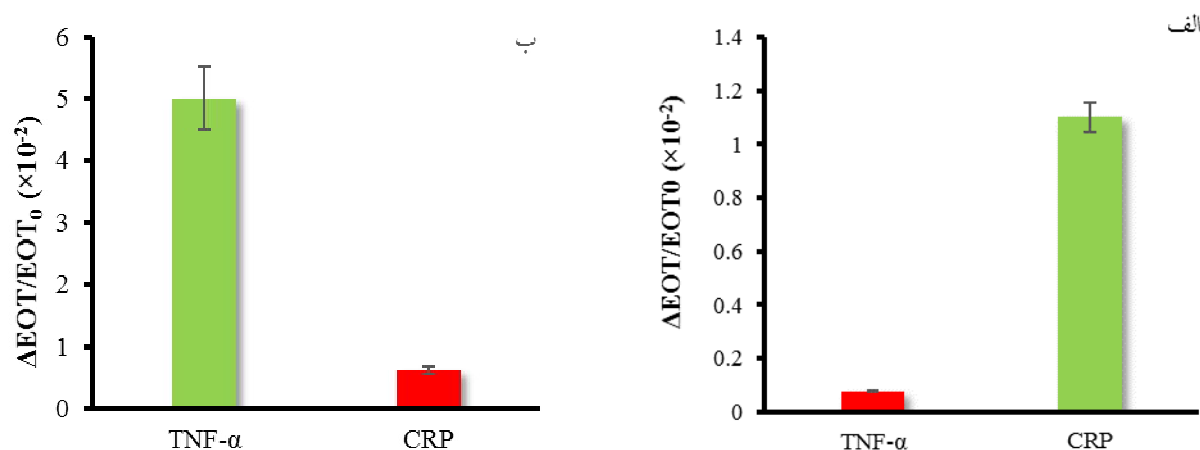
شكل ۵- پاسخ حسگر زیستی اصلاح شده با آبتامر پروتئین واكنش دهنده C به صورت نسبت تغییرات ضخامت نور مؤثر لایه بر حسب غلظت های مختلف از پروتئین پروتئین واكنش دهنده C.

نسبت به مولکول های پروتئین واكنش دهنده C ناشی از احتمال کمتر ورود آن ها به درون حفرات باشد. در صورتی که مولکول های فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا به علت داشتن ابعاد بسیار کوچک تر، به راحتی به درون حفرات وارد شده و تغییرات بیشتری را در ضریب شکست لایه متخلخل ایجاد می کنند.

### ۳-۳- انتخاب پذیری حسگر زیستی

در این بررسی هدف سنجش جذب سطحی غیر اختصاصی و تأیید انتخاب پذیری آبتامر اختصاصی هر نشانگر زیستی است. از آنجایی که این دو نشانگر زیستی در مراحل اولیه سپسیس دیده شده اند و همچنین مقدارشان در سپسیس بالا می رود، بدین ترتیب حسگر زیستی در معرض پروتئین هدف و غیر هدف با غلظت یک میکروگرم بر میلی لیتر قرار گرفته است. (شکل ۷) خلاصه ای از نتایج آزمایش انتخاب پذیری است به طوری که آبتامر حسگر پروتئین واكنش دهنده C در معرض فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا (شکل ۷- الف) و آبتامر حسگر فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا در معرض پروتئین واكنش دهنده C (شکل ۷- ب) قرار گرفت. پس از سپری شدن زمان دوره نهفتگی و

فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا پروتئین ۱۷ کیلو دالتونی است که نه تنها عمدتاً از سلول های ایمنی فعال (ماکروفاژها) بلکه از سلول های غیر ایمنی (فیبروبلاست ها) در پاسخ به محرک های تهاجمی، عفونی یا التهابی مشتق می شود. ترشح فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا از ماکروفاژها، ۳۰ دقیقه پس از تحریک آغاز شده که منجر به افزایش تولید ماکروفاژها از سلول های پیش ساز، فعال شدن و تمایز ماکروفاژها و افزایش بقای آن ها می شود. در نتیجه این اثرات باعث افزایش پاسخ های پیش التهابی در سپسیس می شود (شکل ۶) نمودار تغییرات EOT به EOT₀ بر حسب غلظت های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر یا ۵۷۸/۰۳ نانومولار - ۵/۷۸ پیکومولار از پروتئین TNF-α به صورت خطی است. توجه به این نکته مهم است که مولکول های پروتئین واكنش دهنده C ابعادی در حدود ۴۹ آنگستروم و وزن مولکولی ۱۲۰ کیلو دالتون را دارا هستند. در صورتی که فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا دارای ابعادی در حدود سه آنگستروم و وزن مولکولی ۱۷ کیلو دالتون است؛ بنابراین با مقایسه این ابعاد و ابعاد حفرات سیلیکون متخلخل (شکل ۲- ج)، به نظر می رسد پاسخ اندازه گیری شده کوچک تر



شکل ۷- الف) مقایسه پاسخ آپتاهسگر پروتئین واکنش دهنده C به پروتئین هدف پروتئین واکنش دهنده C و پروتئین غیر هدف فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا و ب) پاسخ آپتاهسگر فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا به پروتئین هدف فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا و پروتئین غیر هدف پروتئین واکنش دهنده C در غلظت یک میکروگرم بر میلی لیتر.

جدول ۱- مقایسه استراتژی های مختلف در تشخیص CRP و TNF-α

روش تشخیص	نشانگر زیستی	محدوده پاسخ خطی	مرجع
فیبر نوری بر پایه رزونانس پلاسمون سطحی	CRP	۰/۲۰-۰۱ μg/ml	[۲۴]
شکست سنجی بر اساس رزونانس	CRP	۰/۲۵-۱/۲۵ μg/ml	[۲۵]
فیبر نوری پلاستیکی بر پایه رزونانس پلاسمون سطحی	CRP	۰/۷۰-۰۶ μg/ml	[۲۶]
کاواک نوری <sup>۲۰</sup>	CRP	۰/۱۰-۰۱ μg/ml	[۲۷]
طیف سنجی تبدیل فوری تداخل بازتابی	CRP	۰/۱۰-۰۱ μg/ml	این تحقیق
طیف سنجی تبدیل فوری تداخل بازتابی	TNF-α	۵۰-۱ ppm	[۲۸]
حسگر ایمنی مبتنی بر بلور کوارتز میکروبالانس	TNF-α	۰/۲-۰۴ μg/ml	[۲۹]
طیف سنجی تبدیل فوری تداخل بازتابی	TNF-α	۰/۱۰-۱ μg/ml	این تحقیق

در جدول (۱) مقایسه ای بین گزارش های مبتنی بر حسگرهای زیستی نوری برای تشخیص پروتئین واکنش دهنده C و فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا با این تحقیق ارائه شده است. همان طور که مشاهده می شود، محدوده خطی نانوحسگر زیستی این تحقیق با مقادیر مشابه دیگر گزارش ها مخصوصاً در تشخیص پروتئین واکنش دهنده C، محدوده حسگری قابل ملاحظه ای را نشان داده است. این نتایج را می توان به اندازه نسبتاً کوچک حفرات نسبت داد که به این مولکول ها اجازه

شستشو، تغییرات ناچیزی مبنی بر پاسخ حسگر زیستی به پروتئین های غیر هدف مشاهده شد که احتمالاً مربوط به جذب سطحی غیراختصاصی به سطح حفرات سیلیکون متخلخل است. این نتایج توانایی این حسگر زیستی را در تشخیص انتخابی پروتئین هدف خود از پروتئین غیر هدف نشان می دهد. این امر به اختصاصی بودن آپتامرها و اصلاح سطح آن نسبت داده می شود که جذب غیراختصاصی مولکول های نامرتبط را به حداقل می رساند.

مزایای مبدل‌های نوری سیلیکون متخلخل، می‌تواند به‌عنوان کاندید مناسبی برای ساخت سامانه‌های سنجش زیستی ساده، انعطاف‌پذیر، ارزان، حساس و قابل حمل مورد استفاده قرار گیرد. نانوحسگر زیستی پیشنهادی می‌تواند به تغییرات غلظت پروتئین واکنش دهنده C و فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا در محدوده سطح فیزیولوژیکی دو نشانگر زیستی در بدن انسان پاسخ دهد. از آنجایی که در سپسیس این دو نشانگر زیستی افزایش غلظت دارند، نتایج آزمایش انتخاب پذیری، قابلیت تفکیک قابل اعتماد پروتئین واکنش دهنده C و فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا را از هم نشان داد. در نتیجه این سامانه می‌تواند جایگزینی مناسبی برای سنجش‌های مبتنی بر پادتن ارائه کند که پتانسیل استفاده در سامانه‌های تشخیصی مرتبط با پروتئین واکنش دهنده C و فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا در مراحل اولیه سپسیس را دارا است.

### تشکر و سپاسگزاری

این مقاله از رساله دوره دکتری تخصصی در دانشگاه تهران استخراج شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور در این طرح (شماره طرح: ۴۰۰۵۵۸۲)، قدردانی و تشکر کنند.

می‌دهد تا چگالی بالاتری از مکان‌های اتصال روی سطح را برای ایجاد حساسیت ایجاد کنند.

### ۴- نتیجه‌گیری

روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه تداخل بازتابی روی بستر سیلیکون متخلخل مبتنی بر اتصال کووالانسی آپتامر، به‌عنوان حسگر زیستی نوری بدون برچسب، برای کاربردهای مختلف امکان سنجش، تشخیص سریع و قابل اعتماد آنالیت را فراهم می‌کند. در این تحقیق، سیلیکون متخلخل با ۷۰ درصد تخلخل و ۳/۶ میکرومتر ضخامت پس از ساخت و اکسیداسیون پایدار، توسط مولکول‌های ۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان و گلو تارآلدئید اصلاح سطح شد تا با اتصال کووالانسی به آپتامر اختصاصی هر نشانگر زیستی، منجر به تشخیص نشانگر زیستی هدف شود. تجزیه و تحلیل طیف بازتابی و تبدیل فوریه از لایه متخلخل نشان دهنده جابه‌جایی محل قله و شدت آن متناظر با غلظت‌های مختلف هر پروتئین است. تشخیص غلظت‌های مختلف از پروتئین هدف از نانومولار تا پیکومولار و عدم اتصال به پروتئین غیرهدف، حساسیت و انتخاب پذیری بالای حسگر زیستی مبتنی بر آپتامر را تأیید می‌کند. از طرف دیگر، برتری آپتامرها به‌عنوان عناصر شناسایی، در دسترس بودن آنها برای اهداف مختلف، گزینش‌پذیری و پایداری عالی، همراه با

### واژه‌نامه

1. toll-like receptors
2. Interleukin 1 $\beta$
3. Interleukin 6
4. tumor necrosis factor  $\alpha$
5. C-reactive protein
6. surface plasmon resonance
7. reflectometric interference fourier transform spectroscopy
8. effective optical thickness
9. latech scientific supply
10. parasitic layer
11. 3- Aminopropyl triethoxysilane
12. Glutaraldehyde
13. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
14. Phosphate buffered saline
15. field emission scanning electron microscopy (FESEM)
16. attenuated total reflectance-fourier-transform infrared spectroscopy
17. spectroscopic liquid infiltration method
18. repeatability
19. reproducibility
20. optical cavity

## مراجع

1. Liu L, Han Z, An F, Gong X, Zhao C, Zheng W, Mei L, Zhou Q. Aptamer-based biosensors for the diagnosis of sepsis. *Journal of Nanobiotechnology* 2021;19:1-22.
2. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view. *Mediators of Inflammation* 2013;2013.
3. Kumar S, Tripathy S, Jyoti A, Singh SG. Recent advances in biosensors for diagnosis and detection of sepsis: a comprehensive review. *Biosensors and Bioelectronics* 2019;124:205-215.
4. Vincent J-L., Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama* 2009;302:2323-2329.
5. Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2013;50:23-36.
6. Buchegger P, Sauer U, Toth-Székely H, Preininger C. Miniaturized protein microarray with internal calibration as point-of-care device for diagnosis of neonatal sepsis. *Sensors* 2012;12:1494-1508.
7. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, Dodek P, Wood G, Kumar A, Simon D, Peters C, Ahsan M, Chateau D. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 2009;136:1237-1248.
8. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent J-L. Sepsis and septic shock. *Nature Reviews Disease Primers* 2016;2:1-21.
9. Park KS. Nucleic acid aptamer-based methods for diagnosis of infections. *Biosensors and Bioelectronics* 2018;102:179-188.
10. Pechorsky A, Nitzan Y, Lazarovitch T. Identification of pathogenic bacteria in blood cultures: comparison between conventional and PCR methods. *Journal of Microbiological Methods* 2009;78:325-330.
11. Urmann K, Walter J-G, Scheper T, Segal E. Label-free optical biosensors based on aptamer-functionalized porous silicon scaffolds. *Analytical Chemistry* 2015;87:1999-2006.
12. Sailor M.J. Porous silicon in practice: preparation, characterization and applications. John Wiley & Sons; 2012.
13. Segal E, Perelman LA, Cunin F, Di Renzo F, Devoisselle JM, Li YY, Sailor MJ. Confinement of thermoresponsive hydrogels in nanostructured porous silicon dioxide templates. *Advanced Functional Materials* 2007;17:1153-1162.
14. Rahimi F. Biosensors based on reflectometric interference fourier transform spectroscopy from porous silicon substrate-theoretical principles and experimental results. *Iranian Physics Research Journal* 2021;21:251-262. (In persian)
15. Ghiasi Tarzi M, Rahimi F, Abouei Mehrizi A, Jalili Shahmansouri M, Ebrahimi Hoseinzadeh B. Real-time biosensing of growth hormone on porous silicon by reflectometric interference fourier transform spectroscopy. *Applied Physics A* 2022;128:1-8.
16. Mariani S, Pino L, Strambini LM, Tedeschi L, Barillaro G. 10 000-fold improvement in protein detection using nanostructured porous silicon interferometric aptasensors. *ACS Sensors* 2016;1:1471-1479.
17. Yaghoubi M, Rahimi F, Negahdari B, Rezayan AH, Shafiekhani A. A lectin-coupled porous silicon-based biosensor: label-free optical detection of bacteria in a real-time mode. *Scientific Reports* 2020;10:1-12.
18. Vilensky R, Bercovici M, Segal E. Oxidized porous silicon nanostructures enabling electrokinetic transport for enhanced DNA detection. *Advanced Functional Materials* 2015;25:6725-6732.
19. Makiyan F, Rahimi F, Hajati M, Shafiekhani A, Rezayan AH, Ansari-Pour N. Label-free discrimination of single nucleotide changes in DNA by reflectometric interference fourier transform spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2019;181:714-720.
20. Rahimi F, Fardindoost S, Ansari-Pour N, Sepehri F, Makiyan F, Shafiekhani A, Rezayan AH. Optimization of porous silicon conditions for DNA-based biosensing via reflectometric interference spectroscopy. *Cell Journal (Yakhteh)* 2019;20:584.
21. Arshavsky-Graham S, Urmann K, Salama R, Massad-Ivanir N, Walter J-G., Scheper T, Segal E. Aptamers vs. antibodies as capture probes in optical porous silicon biosensors. *Analyst* 2020;145:4991-5003.
22. Mello MLS, Vidal B. Changes in the infrared microspectroscopic characteristics of DNA caused by cationic elements, different base richness and single-stranded form. *Plos One* 2012;7:1-12.
23. Pova P, Coelho L, Almeida E, Fernandes A, Mealha R, Moreira P, Sabino H. C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. *Clinical Microbiology and Infection* 2005;11:101-108.
24. Wang W, Mai Z, Chen Y, Wang J, Li L, Su Q, Li X, Hong X. A label-free fiber optic SPR biosensor for specific detection of C-reactive protein. *Scientific Reports* 2017;7:1-8.
25. Zubiate P, Zamarreño C, Sánchez P, Matias I, Arregui F. High sensitive and selective C-reactive protein detection by means of lossy mode resonance based optical fiber devices. *Biosensors and Bioelectronics* 2017;93:176-181.
26. Aray A, Chiavaioli F, Arjmand M, Trono C, Tombelli S, Giannetti A, Cennamo N, Soltanolkotabi M, Zeni L, Baldini F. SPR-based plastic optical fibre biosensor for the detection of C-reactive protein in

- serum. *Journal of Biophotonics* 2016;9:1077-1084.
27. Rho D, Kim S. Demonstration of a label-free and low-cost optical cavity-based biosensor using streptavidin and C-reactive protein. *Biosensors* 2020;11:4.
28. Say R, Diltemiz SE, Çelik S, Ersöz A. Nanolabel for TNF-A determination. *Applied Surface Science* 2013;275:233-238.
29. Bahk Y-K, Kim H-H, Park D-S, Chang S-C, Go J-S. A new concept for efficient sensitivity amplification of a QCM based immunosensor for TNF-A by using modified magnetic particles under applied magnetic field. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 2011;32:4215-4220.