

سنتز و مشخصه‌یابی میکروژل مغناطیسی هیبریدی جهت شناسایی سلول‌های سرطانی سینه

محمد مهدی پیران^۱، مهشید خرازیها^۱ و سعید شبانی^۲

۱- دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان ۸۴۱۵۶-۸۳۱۱۱، ایران

۲- دانشکده مهندسی متالورژی و مواد، دانشکدگان فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۱۳)

چکیده: هدف از پژوهش حاضر سنتز میکروژل مغناطیسی حاوی نانومیل‌های کبالت فریت است که با آپتامر سطح آن اصلاح شده و برای جداسازی و شناسایی کارآمد سلول‌های سرطانی سینه در حضور میدان مغناطیسی استفاده می‌شود. به منظور ساخت میکروژل مغناطیسی حاوی نانومیل‌های کبالت فریت در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۵ درصد وزنی پلی‌وینیل‌الکل سنتز شد. پس از پوشش‌دهی نانومیل‌های کبالت فریت با کیتوسان، میکروژل نانوکامپوزیتی آلژینات-حاوی نانومیل‌های کبالت فریت سنتز و مشخصه‌یابی شد. به منظور دستیابی به میکروژل مغناطیسی بهینه، ابتدا میکروژل مغناطیسی در pHهای مختلف سنتز شدند و نمونه سنتز شده که pH محلول آلژینات آن ۷ و pH محلول نهایی آن ۳ (7alg-3) بود به دلیل اندازه تخلخل و درصد تخلخل سطحی بهتر انتخاب شد. آزمون میکروسکوپی الکترونی روبشی، به منظور بررسی خواص ساختاری و مورفولوژی میکروژل‌های مغناطیسی انجام شد. در نهایت سطح میکروژل بهینه با آپتامر میوسین ۱ اصلاح شد و آزمون طیف‌نمایی مرئی-فرابنفش برای بررسی اتصال آپتامر به سطح میکروژل انجام شد. در نتیجه اقدامات مذکور آپتاسگر مغناطیسی با قابلیت تشخیص سلول‌های سرطانی mcf7 و سنجش مغناطش اشباع ساخته شد. برای بررسی خواص فیزیکی و ساختاری آپتاسگر مغناطیسی و اجزای تشکیل‌دهنده آن آزمون‌های عکس‌برداری میکروسکوپی الکترونی روبشی، آزمون طیف‌نمایی مرئی-فرابنفش و آزمون مغناطومتري نمونه ارتعاشی انجام شد. با استفاده از آزمون مغناطومتري نمونه ارتعاشی و بررسی نتایج آن حد تشخیص و حساسیت آپتاسگر اندازه‌گیری شد و به ترتیب مقادیر ۱۴ سلول در میلی‌لیتر و ۱۸ Ms/cell به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: سرطان، آپتامر میوسین ۱، نانومیل‌های مغناطیسی کبالت فریت، آپتاسگر مغناطیسی، سلول‌های سرطانی mcf7.

Synthesis and Characterization of Magnetic Hybrid Microgels for Identification of Breast Cancer Cells

M. M. Piran^{1*}, M. Kharaziha¹ and S. Sheibani²

1- Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran

2- School of Metallurgy and Materials Engineering, College of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran

ABSTRACT

The objective of the current study is to synthesize magnetic microgels containing cobalt ferrite nanorods, surface modified with aptamer, for efficient separation and identification of breast cancer cells in the presence of a magnetic field. To construct magnetic microgels, cobalt ferrite nanorods were synthesized at 600 °C with a 5 wt.% of polyvinyl alcohol. The synthesized cobalt ferrite nanorods were successfully coated with chitosan, and then the coated nanorods were loaded into alginate microgels. Magnetic microgel samples were synthesized at different pH levels to achieve the optimal magnetic microgels. The sample synthesized at pH 7 of alginate solution and a final pH of 3 (7alg-3) was chosen due to its better size of the porosity and the percentage of surface porosity. Scanning electron microscopy test was conducted to investigate the morphological, and structural properties of nanorods and magnetic microgels. Finally, the surface of the optimal microgel was modified with mucin 1 aptamer, and visible-UV spectroscopy tests were performed to examine the aptamer attachment to the microgel surface. As a result of these efforts, a magnetic aptasensor capable of detecting MCF7 cancer cells and measuring saturation magnetization was developed. Physical and structural properties of the magnetic aptasensor and its components were investigated using scanning electron microscopy, visible-UV spectroscopy, and vibrating sample magnetometry tests. The detection limit and sensitivity of the aptasensor were measured, resulting in 14 cells/mL and a sensitivity of 0.18 Ms/cell.

Keywords: Cancer, Mucin 1 aptamer, Cobalt ferrite magnetic nanorods, Magnetic aptasensor, MCF7 cancer cells.

۱- مقدمه

نشانه‌گر سطحی روی سلول‌های بنیادی جنینی تمایز نیافته^۳ به دلیل تنوع زیاد در بیان ژن بین زیرگروه‌های تومور، نشانگر مناسبی برای تشخیص سلول‌های سرطانی سینه نیست. از دیگر روش‌های تشخیص سلول‌های سرطانی سینه، استفاده از آپتامرها^۴ می‌باشد. آپتامرها توالی‌های تک‌رشته‌ای کوتاه از اسیدهای نوکلئیک^۵ هستند که می‌توانند به‌طور اختصاصی برای هر گیرنده هدف از طریق یک فرآیند تکراری در شرایط آزمایشگاهی موسوم به سلکس^۶ (تکامل سیستماتیک لیگاندها توسط غنی‌سازی اکسپوننشال) ایجاد شوند. در مقایسه با آنتی-بادی‌ها، مهم‌ترین مزیت آپتامرها ستیز درون کشتگاهی آن است، هم‌چنین دیگر مزیت‌های آپتامر نسبت به آنتی‌بادی برای جداسازی سلول‌های سرطانی سینه، چسبندگی، پایداری مولکولی آن‌ها و بی‌حرکتی سطحی کارآمد است (۵). در پژوهشی، یک آپتاسنگر ساده و مقرون به صرفه بر پایه نانولوله‌های اکسید تیتانیم-اکسید گرافن کاهش یافته اصلاح

سرطان نتیجه انباشت جهش در ژن‌های حاکم بر فنوتیپ تومور^۱ است. همه سرطان‌ها منشا ژنتیکی دارند و نیروی محرک رشد تومور جهش ژنتیکی^۲ است (۱ و ۲). با وجود همه تلاش‌ها، سرطان هنوز هم عامل اصلی مرگ در جهان است. در سال ۲۰۰۸، سرطان جان ۷/۶ میلیون نفر را گرفت (۱۳ درصد از مرگ و میر کل انسان‌ها) و پیش‌بینی می‌شود که این تعداد در سال ۲۰۳۰ به ۱۳ میلیون نفر برسد. یکی از متداول‌ترین و مؤثرترین روش‌ها برای شناسایی سلول‌های سرطانی سینه، روش‌های مبتنی بر آنتی‌بادی و آپتامر است. جداسازی سلول‌های تومور گردشی مبتنی بر آنتی‌بادی با استفاده از یک "ماتریس" با واسطه آنتی‌بادی که سلول‌های سرطانی سینه به‌طور مستقیم، یا غیرمستقیم، جذب می‌شوند، تحقق می‌یابد (۳). متاسفانه، هیچ آنتی‌بادی به تنهایی برای جذب و کشف کلیه سلول‌های سرطانی نادر مناسب نیست (۴). به‌عنوان مثال،

عالی برجسته شده‌اند. در پژوهشی توسط صیفوری و همکاران (۹)، میکروژل‌های مغناطیسی بر پایه PNIPAM-AA^۱ و حاوی نانوذرات مغناطیسی فریت آهن سنتز شد و جهت جداسازی سلول‌های سرطانی سینه با آنتی‌بادی anti-EpCAM اصلاح شدند. نتایج به‌دست آمده از مشخصه‌یابی این حسگر نشان داد که میکروژل‌های حاوی آنتی‌بادی تعبیه شده به‌صورت غیرمستقیم، توانایی جداسازی سلول MCF-7 با حداکثر راندمان ۸۹ درصد را نشان دادند، درحالی‌که جذب سلول غیراختصاصی قابل توجهی برای این میکروژل‌ها گزارش نشد. به‌طور کلی، از انواع گوناگون پلیمرهای طبیعی و مصنوعی جهت سنتز میکروژل‌ها استفاده می‌شود (۱۱). آلزینات یک پلی‌ساکارید طبیعی است که از جلبک‌های قهوه‌ای به‌دست می‌آید. هیدروژل‌های آلزینات را می‌توان با روش‌های مختلف از جمله کراس لینک تهیه کرد، و شباهت ساختاری آن‌ها با ماتریس‌های خارج سلولی بافت‌های زنده امکان استفاده گسترده آن‌ها در ترمیم زخم، رهایش عوامل فعال‌کننده زیستی مانند داروهای شیمیایی کوچک و پروتئین‌ها و پیوند سلولی را فراهم می‌آورد. مهم‌ترین خواص آلزینات که موجب جذابیت آن برای کاربردهای زیست پزشکی شده است عبارتند از: زیست سازگاری، شرایط ژل شدن ملایم (نه سخت و شدید) و امکان تهیه مشتقات آلزینات با خواص جدید با ایجاد اصلاحات ساده در ساختار آن (۱۲ و ۱۳). با توجه به مطالعات انجام شده، تحقیقات محدودی در خصوص شناسایی و جداسازی هم‌زمان سلول‌های سرطانی سینه توسط میکروژل‌ها انجام شده است و استفاده هم‌زمان از آپتامر و میکروژل مغناطیسی جهت شناسایی و جداسازی سلول‌ها انجام نشده است. در پژوهش حاضر، خواص و ویژگی‌های میکروژل‌های مغناطیسی جهت شناسایی و جداسازی سلول‌های سرطانی سینه مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- مواد

در پژوهش حاضر، نانومیل‌های مغناطیسی فریت کبالت به

شده با آپتامر MUC1 برای تشخیص الکتروشیمیایی سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) توسط صفوی‌پور و همکارانش (۶) توسعه داده شد. یکی دیگر از روش‌های جداسازی سلول‌های سرطانی سینه استفاده از نانوذرات مغناطیسی هست. از آنجا که اندازه نانوذرات مغناطیسی قابل مقایسه با DNA یا ساختارهای درون سلولی است و در کنار این مزیت سطح بالایی برای پیوند با عوامل شناسایی‌کننده در اختیار قرار داده و همچنین امکان جداسازی مؤثر سلول‌های سرطانی سینه را با استفاده از نیروی مغناطیسی به‌عنوان نیروهای محرک خارجی، فراهم می‌کند، استفاده از نانوذرات مغناطیسی روشی مؤثر برای جداسازی کارآمد و مؤثر سلول‌های سرطانی سینه محسوب می‌شود. خواص فیزیکی بسیار خوب و پایداری شیمیایی بالا امکان استفاده از فریت‌ها در کاربردهای با جذب مغناطیسی کم را فراهم کرده است. پایین بودن نیروی جذب مغناطیسی اکسیدهای خالص آهن، همواره چالشی بزرگ برای کاربردهای نیازمند به میزان بالای جذب مغناطیسی بوده است. فریت کبالت (CoFe₂O₄) یک ماده مغناطیسی شناخته‌شده سخت، با وادارندگی مغناطیسی بالا (Hc) پایداری شیمیایی فوق‌العاده و مغناطش اشباع (Ms) متوسط است. این خواص آن را به یک ماده مناسب برای کاربردهای جذب مغناطیسی بالا، تبدیل می‌کند (۷ و ۸). با وجود اهمیت بالای نانوذرات مغناطیسی در جداسازی سلول‌های مختلف، سمیت احتمالی نانوذرات مغناطیسی به دلیل واکنش سلولی، و همچنین پایداری پایین نانو ساختارهای مغناطیسی، عملکرد آن‌ها را در جذب سلول و تکثیر سلولی متعاقب آن محدود می‌کند. در این راستا، استفاده از میکروژلات هیدروژلی با پایداری زیستی مناسب و بازده بالای بارگذاری آنتی‌بادی/آپتامر توسعه یافته است (۹). میکروژل‌ها ذرات کلوئیدی با شبکه‌های ماکرومولکولی و با ابعاد مختلف از ده‌ها نانومتر تا چند میکرومتر هستند که قادر به جذب مقدار قابل توجهی از حلال (معمولاً آب) هستند (۱۰). در میان مواد هوشمند، میکروژل‌ها به دلیل ویژگی‌های عالی خود از جمله محتوای آب بالا، ساختارهای شیمیایی و فیزیکی مطلوب، خواص مکانیکی خوب و زیست سازگاری

۲-۲-۲- پوشش دهی نانومیله‌های مغناطیسی کبالت فریت

جهت پوشش دهی نانومیله‌ها با کیتوسان از روش صیفوری و همکاران (۱۵)، استفاده شد. به این منظور، ۱۰ میلی‌لیتر از نانومیله‌های مغناطیسی کبالت فریت با غلظت ۱/۵ درصد وزنی در آب دوبار تقطیر آماده شد. سپس، مقدار برابر محلول ستریمونیوم برومید با غلظت ۲۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به سوسپانسیون نانومیله‌ها اضافه شد. محلول به‌دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در حمام یخ تحت آلتراسونیک حمامی با توان ۶۰ درصد قرار گرفت. در ادامه، به محلول بالای ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول کیتوسان (۰/۰۲ گرم کیتوسان در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول یک درصد وزنی / حجمی استیک اسید) افزوده شد و به مدت یک ساعت به کمک همزن مکانیکی با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه همزده شد. در ادامه، نانومیله‌های مغناطیسی پوشش داده شده به کمک آهنربا از محلول جدا شد.

۲-۲-۳- سنتز میکروژل مغناطیسی آلزینات-نانومیله کبالت فریت

جهت سنتز میکروژل مغناطیسی، از روش پیشنهادی در پژوهش فنگ و همکاران (۱۶) استفاده شد. به این منظور، ابتدا ۱/۱ گرم آلزینات به ۳/۷۵ میلی‌لیتر آب برای ساختن محلول ۲/۶۶ درصد وزنی / حجمی آلزینات اضافه شده و در دمای اتاق تا به‌دست آمدن محلول یک‌دست همزده شد. در ادامه، جهت بررسی نقش pH محلول در تشکیل میکروژل مغناطیسی، pH محلول با استفاده از محلول یک مولار هیدروکلریک اسید و محلول یک مولار سدیم هیدروکسید بر روی ۵، ۷ و ۹ تنظیم شد. در ادامه ۱/۲۵ میلی‌لیتر از محلول آلزینات با سوسپانسیون نانومیله‌های کبالت فریت پوشش داده شده با کیتوسان (۰/۹ درصد وزنی / حجمی) به محلول قبلی اضافه شد و pH محلول نهایی مجدد با استفاده از محلول‌های هیدروکلریک اسید یک مولار و سدیم هیدروکسید یک مولار بر روی اعداد ۱، ۳ و ۵ تنظیم شد. جهت تسهیل در اشاره به نوع هر نمونه با توجه به مؤلفه‌های مهم سنتز هر یک از این نمونه‌ها برای هر کدام نام اختصاری در

کمک کلرید کبالت ۶ آبه ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)، کلرید آهن ۴ آبه، اگزالیک اسید ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) و پلی‌وینیل‌الکل $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x$ سنتز شدند. در ادامه به‌منظور پوشش دهی نانومیله‌های فریت کبالت با کیتوسان، از کیتوسان ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4\text{X}_2$)، استیک اسید (CH_3COOH) و ستریمونیوم برومید ($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$) استفاده شد. میکروژل‌های مغناطیسی با استفاده از آلزینات ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$) سود سوزآور (NaOH) و هیدروکلریک اسید (HCl) سنتز شدند. همچنین به‌منظور اصلاح سطح میکروژل مغناطیسی از آپتامر میوسین ۱، ۱-اتیل-۳-(۳-دی‌متیل آمین پروپیل) کربودی ایمید^۹ و ان هیدروکسی سوکسینیمید^{۱۰} استفاده شد. همه مواد استفاده شده در این پژوهش به جز آپتامر میوسین ۱ (بایونیر) تهیه شده از شرکت مرک آلمان با خلوص ۹۹/۹ درصد است.

۲-۲-۲- مراحل ساخت

۲-۲-۱- سنتز نانومیله‌های مغناطیسی کبالت فریت

نانومیله‌های مغناطیسی کبالت فریت با روش سنتز دومارحله‌ای بر اساس روش یائو و همکاران (۱۴)، ساخته شدند. در مرحله اول، یک پیش‌ساز اگزالات با رسوب در محلول آبی در دمای اتاق، با استفاده از پلی‌وینیل‌الکل، به‌عنوان سورفکتانت برای کمک به تهیه نانومیله‌ها سنتز شد. ابتدا، 6×10^{-3} مول کلرید آهن ۴ آبه و 3×10^{-3} مول کلرید کبالت ۶ آبه در شش میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل شدند. سپس، ۱۵ میلی‌لیتر محلول پلی‌وینیل‌الکل (غلظت پنج درصد وزنی / حجمی) به محلول قبلی اضافه شد. پس از آن، مقدار معادل از محلول ۲۰ درصد وزنی اسید اگزالیک به‌صورت قطره قطره به مدت دو دقیقه اضافه شد. محلول نهایی به مدت ۳۰ دقیقه تحت همزدن شدید قرار گرفت و رسوب زرد رنگی ایجاد شد. پس از سانتریفیوژ محلول، رسوب زرد رنگ جدا شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خشک شد. در مرحله دوم، پودر اگزالات به‌دست آمده در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد کلسینه شدند. در نهایت یک پودر ریز سیاه‌رنگ به‌دست آمد.

جدول ۱- نمونه‌های میکروژل آلژینات و نمونه نانوذره پوشش

داده شده با کیتوسان		
نمونه	pH محلول آلژینات	pH محلول نهایی
5alg-1	۵	۱
5alg-3	۵	۳
5alg-5	۵	۵
7alg-1	۷	۱
7alg-3	۷	۳
7alg-5	۷	۵
9alg-1	۹	۱
9alg-3	۹	۳
9alg-5	۹	۵
Chi-nr	-	-

جدول ۲- نمونه‌های هیبرید میکروژل مغناطیسی ساخته شده در

غلظت‌های مختلف سلولی		
نمونه	اصلاح شده/نشده با آپتامر	تعداد سلول
	muc1	mcf7
7alg-3-A	×	۱۰۰
7alg-3-B	×	۵۰۰
7alg-3-C	×	۱۰۰۰۰
7alg-3-apt-A	✓	۱۰۰
7alg-3-apt-B	✓	۵۰۰
7alg-3-apt-C	✓	۱۰۰۰۰
7alg-3-apt-D	✓	۵۰۰۰۰

میکرومولار در سه میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر رقیق شد). محلول به‌دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد تحت همزدن آرام قرار گرفت سپس به مدت ۲۴ ساعت تحت خشک‌کایش انجمادی قرار گرفت.

نظر گرفته‌شده که در جدول (۱) ارائه شده است. در نهایت، محلول به‌دست آمده جهت حذف نمک سدیم کلرید که در اثر واکنش هیدروکلریک اسید و سدیم هیدروکسید ایجاد شده بود به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق در محیط آبی به حجم ۲ لیتر دیالیز شده و پس از حذف نمک محلول سپس به مدت ۲۴ ساعت تحت خشک‌کایش انجمادی قرار گرفت.

۲-۲-۵- کشت سلولی و تهیه سوسپانسیون سلولی آپتاسگر

مغناطیسی

به‌منظور ارزیابی توانایی شناسایی و جذب سلولی آپتاسگر مغناطیسی ۵/۰ و ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از نمونه‌های 7alg-3-apt و 7alg-3 در محیط کشت در غلظت‌های مختلف سلولی (۱۰۰۰۰ و ۵۰۰۰۰۰ سلول mcf7) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد از شناسایی و جذب سلولی، سوپرناتانت حذف شد و سلول‌های جذب شده سه بار بوسیله بافر فسفات سالین شسته شد. سپس به‌منظور ثابت‌سازی سلول‌های جذب شده از فرمالدهید استفاده شد و نمونه‌های حاوی سلول در دمای اتاق خشک شدند. نامگذاری نمونه‌ها طبق جدول (۲) انجام شده است.

۲-۲-۴- اصلاح سطح میکروژل‌های مغناطیسی با آپتامر

میوسین ۱

بعد از بهینه‌سازی میکروژل‌های مغناطیسی، ۰/۰۲ گرم از میکروژل تهیه شده در مرحله قبل در دو میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر توزیع شده و به‌منظور ایجاد برهم‌کنش بین گروه‌های کربوکسیل آلژینات و آمین آپتامر، ۰/۰۰۹۶ گرم ۱-اتیل-۳-(۳-دی‌متیل آمین پروپیل) کربو دی‌ایمید و ۰/۰۲۶۴ گرم آن هیدروکسی سوکسینیمید به آن افزوده شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه و واکنش در دمای اتاق، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی یک میکرومولار آپتامر میوسین ۱ با توالی (GCAGTTGATCCTTTGGATACCTGG) به آن افزوده شد (۳۰ ماکرولیتر محلول خریداری شده آپتامر ۱۰۰

۳- نتایج و بحث

۳-۱- خواص ساختاری و مورفولوژی میکروژل مغناطیسی

به‌منظور دستیابی به نمونه بهینه از لحاظ تخلخل و پراکندگی

حاوی نانومیله کبات فریت $13 \pm 67\%$ درصد به‌دست آمد. بر طبق نتایج به‌دست آمده از بخش آزمون ارزیابی عنصری با طیف‌سنجی تفکیک انرژی پرتو ایکس^{۱۲} می‌توان با اطمینان گفت که میکروژل‌ها حاوی نانوذرات مغناطیسی کبات فریت هستند که درصدهای مربوط به هر یک از عناصر حاضر در میکروژل در تصویر قابل مشاهده است (شکل ۲).

تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی نمونه 7alg-3-apt در مقایسه با نمونه 7alg-3 نشان‌دهنده تغییراتی در ساختار میکروژل بعد از پوشش‌دهی با آپتامر است. به دلیل اصلاح سطح نمونه 7alg-3 با آپتامر، سطح میکروژل مغناطیسی با آپتامر پوشانده شده و نانوذرات در ساختار میکروژل مغناطیسی قابل‌شناسایی نیستند (شکل ۳).

۳-۲- آزمون طیف‌نمایی مرئی - فرابنفش

به‌منظور بررسی تشکیل یا عدم تشکیل پیوند آپتامر با سطح میکروژل از آزمون طیف‌نمایی مرئی-فرابنفش^{۱۳} نیز کمک گرفته شد. در همین راستا محلولی با غلظت 100 g/ml حاوی میکروژل اصلاح شده با آپتامر تحت آزمون طیف‌نمایی مرئی-فرابنفش قرار گرفت. با توجه به این‌که عموماً آپتامرها در محدوده ۲۶۰-۲۵۰ نانومتر دارای پیک هستند، از محدوده فرابنفش دستگاه یعنی محدوده ۴۰۰-۲۰۰ نانومتر برای شناسایی طیف جذبی آپتامر میوسین ۱ استفاده شد. با توجه به نتیجه حاصله و پیک تشکیل شده در محدوده ۲۵۸ نانومتر که مختص آپتامر است می‌توان نتیجه گرفت که آپتامر به‌خوبی با سطح تشکیل پیوند داده است (شکل ۴). شارما و همکاران (۱۷)، برای اولین بار، به توسعه نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2) بر مبنای پلتفرم آپتاسنینگ برای تشخیص مولکول‌های هدف پرداختند. بر طبق نتایج آزمون طیف‌نمایی مرئی-فرابنفش آپتامر استفاده شده در این پژوهش در محدوده عدد موجی ۲۶۰-۲۵۵ نانومتر نوار جذبی داشته و مشابه نتیجه پژوهش حاضر بوده است. نانوساختارهای فلزی-آلی پورفیرینیک مقیاس نانویی مبتنی بر زیرکونیم با تغییرات آپتامر برای درمان

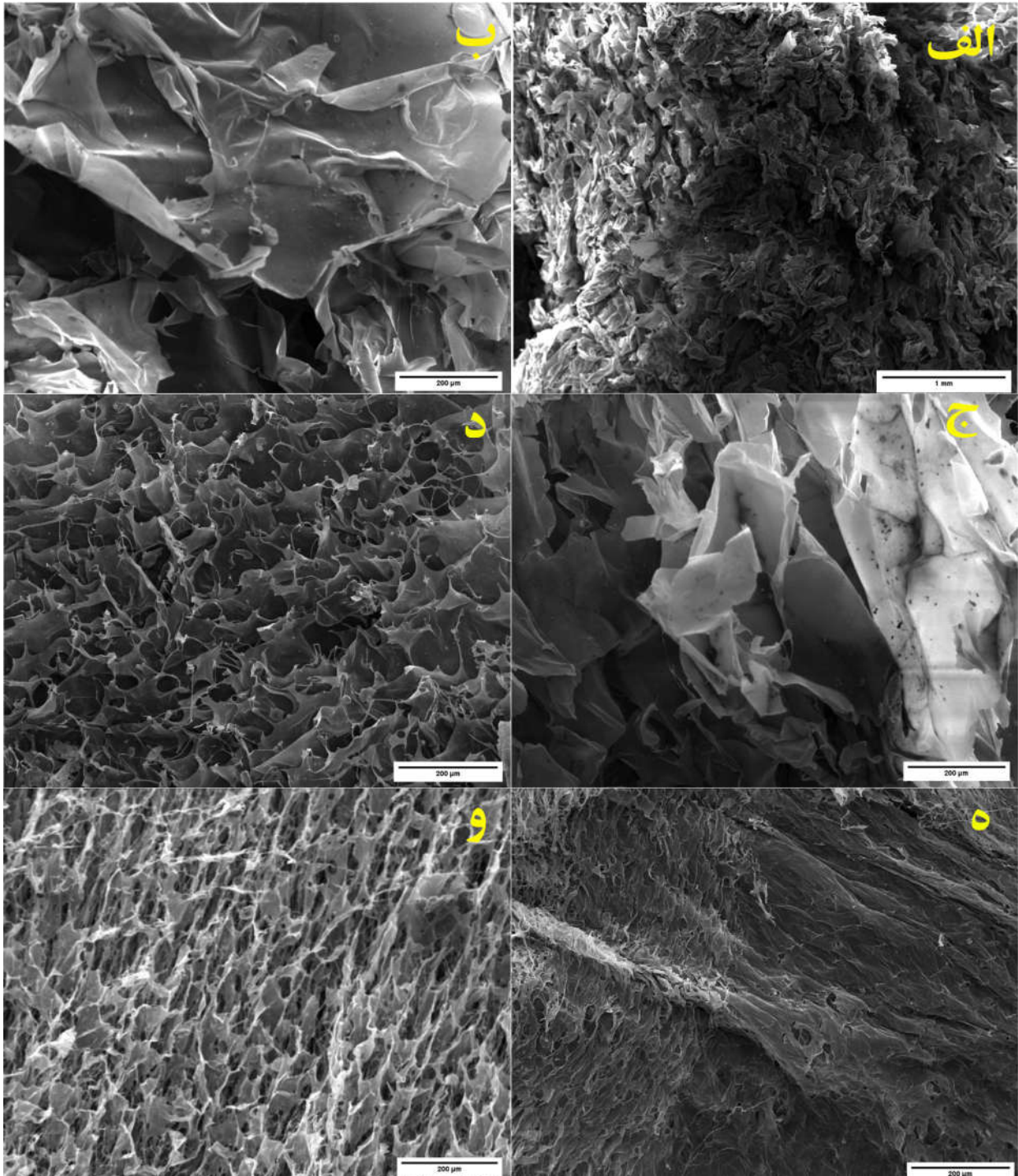
جدول ۳- درصد تخلخل سطحی نمونه‌های میکروژل مغناطیسی حاوی نانوذرات مختلف و غلظت‌های متفاوت

نمونه (بر اساس محتوای نانوذره)	تخلخل سطحی (درصد)	اندازه تخلخل (μm)
5alg-3	۴۹	۲۱۶
5alg-5	۴۰	۲۰۰
7alg-3	۵۱	۱۹۷
7alg-5	۵۸	۴۶
9alg-3	۵۹	۶
9alg-5	۶۰	۱۷

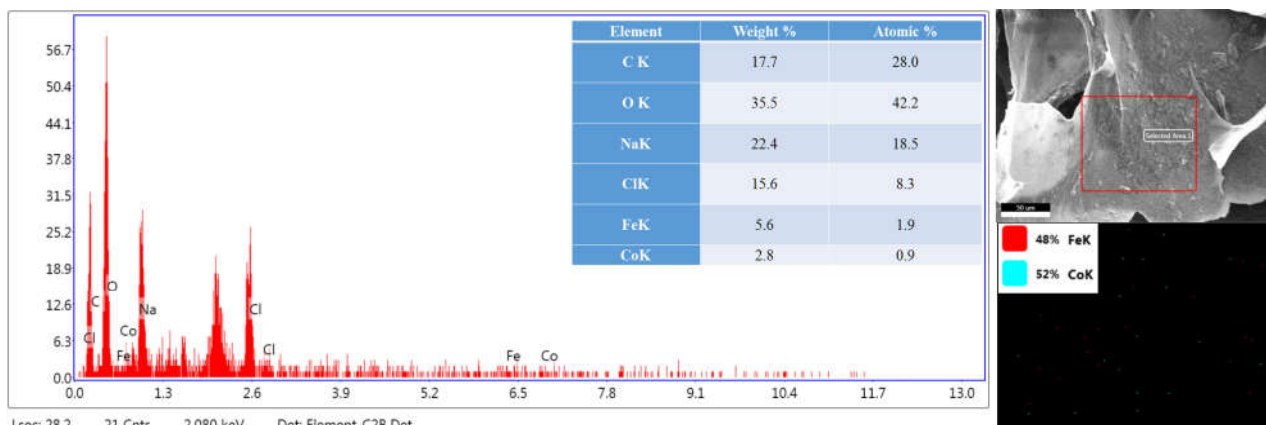
همگن نانوذرات میکروژل‌های مغناطیسی با pH‌های مختلف محلول آلزینات و محلول نهایی سنتز شدند. pH محلول آلزینات بر روی اعداد ۵، ۷ و ۹ تنظیم شد. و pH محلول نهایی که حاصل اختلاط محلول آلزینات و محلول نانوذره یا نانومیله با درصدهای وزنی به حجمی متفاوت است بر روی اعداد ۱، ۳ و ۵ تنظیم شد.

هم‌چنین درصد تخلخل سطحی نمونه‌های میکروژل مغناطیسی حاوی نانوذرات مختلف با غلظت‌های متفاوت در جدول (۳) آورده شده است. اندازه تخلخل‌ها و درصد تخلخل سطحی نمونه‌ها با استفاده از نرم افزار ImageJ محاسبه شده است. بر اساس تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی^{۱۱} میکروژل 7alg-3 به‌عنوان نمونه بهینه به لحاظ تخلخل، خواص مورفولوژی و پراکندگی همگن نانوذرات انتخاب شد (شکل ۱).

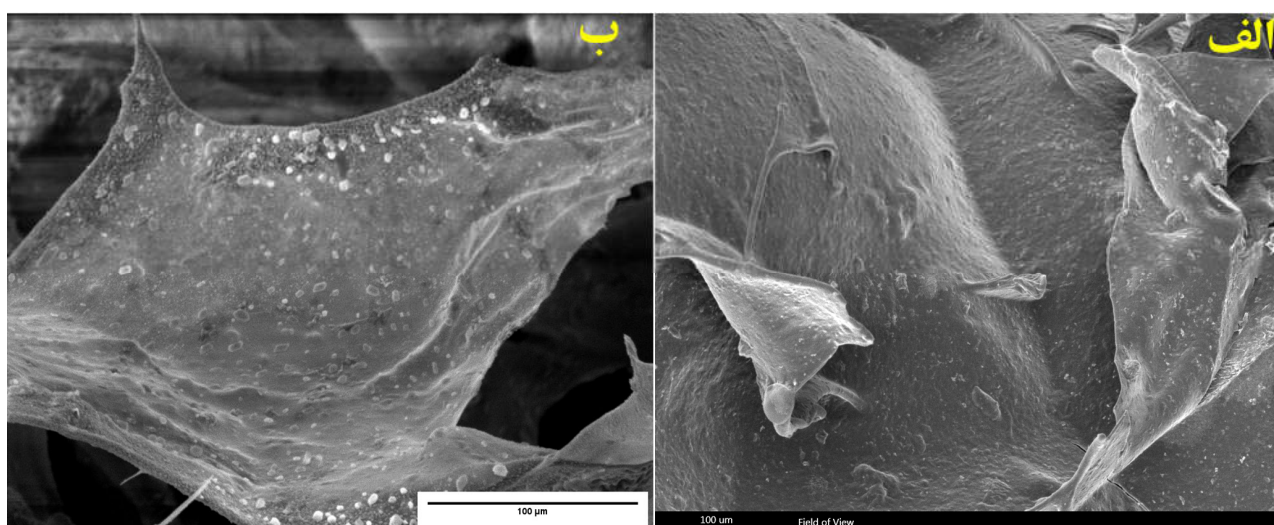
به‌منظور دستیابی به نمونه بهینه از لحاظ تخلخل و پراکندگی همگن نانوذرات میکروژل‌های مغناطیسی با pH‌های مختلف محلول آلزینات و محلول نهایی سنتز شدند. pH محلول آلزینات بر روی عدد ۷ تنظیم شد. pH محلول نهایی که حاصل اختلاط محلول آلزینات و محلول نانوذره یا نانومیله با درصدهای وزنی به حجمی متفاوت است بر روی عدد ۳ تنظیم شد. هم‌چنین درصد تخلخل سطحی نمونه میکروژل مغناطیسی



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی در دو بزرگ‌نمایی مختلف از میکروژل‌های مغناطیسی pHهای مختلف محلول اولیه و محلول نهایی که به ترتیب از بالا به پایین متعلق به نمونه‌های با ترکیب pH (الف) 3alg-5، (ب) 5alg-5، (ج) 7alg-3، (د) 7alg-5، (ه) 9alg-3 و (و) 9alg-5.

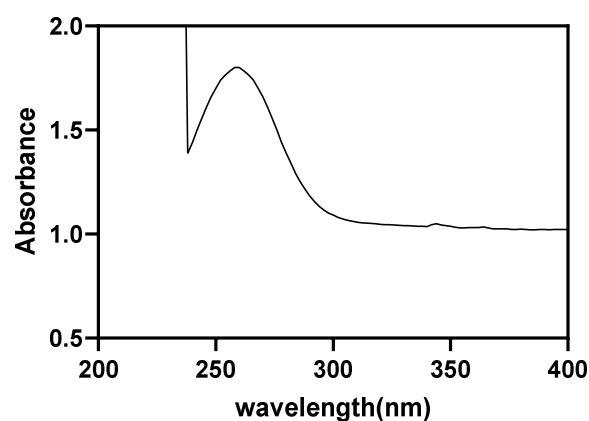


شکل ۲- تصویر و طیف آزمون ارزیابی عنصری با طیف‌سنجی تفکیک انرژی پرتو ایکس.



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی نمونه‌های الف (7alg-3-apt) و ب (7alg-3).

همکاران (۱۸) توسعه داده شد. مطالعه نشان داد که جذب UV-Vis اسید دی‌ان‌ای در طول موج ۲۶۰ نانومتر پس از اصلاح موفق آبتامر Apt-M بر روی نانوذرات DOX@PCN-224 به طرز قابل توجهی کاهش یافت. این نکته نشان می‌دهد که آبتامر یک پیک جذب حول طول موج ۲۵۰-۲۶۰ نانومتر داشت.



شکل ۴- آزمون طیف نمای مرئی- فرابنفش نمونه 7alg-3-apt.

۳-۳- ارزیابی خواص مغناطیسی آبتاحسگرهای مغناطیسی
باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمون مغناطومتر نمونه ارتعاشی^{۱۴}، با افزایش غلظت سلول‌های mcf7 هم در نمونه 7alg-3-apt و هم در نمونه 7alg-3 مغناطش اشباع آبتاحسگر

شیمیایی-فتودینامیکی هدفمند فعال سرطان‌ها توسط فنگ و

جدول ۴- مقادیر مغناطش اشباع و وادارندگی مغناطیسی نمونه‌های اصلاح شده/نشده با آپتامر در غلظت‌های مختلف

نمونه	سلولی	
	اشباع	مغناطش
(Oe)	(emu/g)	وادارندگی مغناطیسی
7alg-3-A	۴/۳	۱۸۰۰
7alg-3-0/9-B	۴/۲	۱۸۰۰
7alg-3-0/9-C	۳/۶	۱۸۰۰
7alg-3-0/9-apt-A	۳/۱	۱۸۰۰
7alg-3-0/9-apt-B	۲/۹	۱۸۰۰
7alg-3-0/9-apt-C	۲/۸	۱۸۰۰
7alg-3-0/9-apt-D	۲/۶	۱۸۰۰

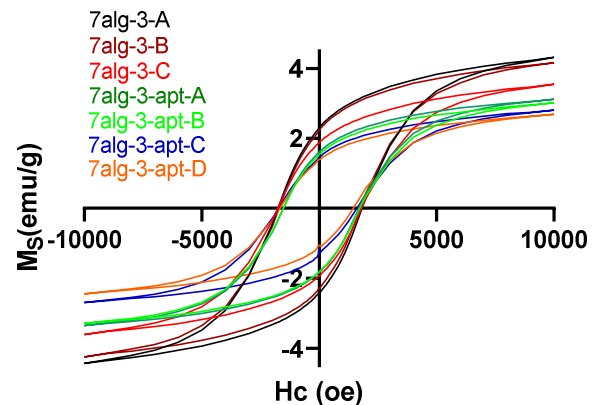
سنتز شدند و نهایتاً نمونه 7alg-3 به دلیل خواص بهینه مورفولوژی و دانسیته تخلخل انتخاب شد. میکروژل مغناطیسی بهینه به منظور برهم‌کنش با سلول‌های سرطانی mcf7 با موفقیت با آپتامر پوشش داده شد. حد تشخیص و حساسیت آپتاسنگر ساخته شده به ترتیب مقادیر ۱۴ سلول در میلی‌لیتر و Ms/cell ۰/۱۸ به دست آمد.

تشکر و سپاسگزاری

تامین کننده اعتبار پژوهشی این مقاله دانشگاه صنعتی اصفهان بوده، در همین راستا از کمک های این دانشگاه تقدیر می‌شود.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اذعان دارند هیچ نوع تضاد منافی با شخص، شرکت یا سازمانی برای این پژوهش ندارند.



شکل ۵- آزمون VSM نمونه‌های 7alg-3 و 7alg-3-apt در غلظت‌های مختلف سلولی.

نمونه‌ها کاهش یافته است. همچنین با اصلاح سطح نمونه 7alg-3 با افزایش غلظت سلول‌های سرطانی mcf7 مغناطش اشباع کاهش یافته است نشان‌دهنده نقش مؤثر آپتامر در افزایش حساسیت‌پذیری آپتاسنگر است. در مطالعه‌ای مشابه که توسط صیفوری و همکاران (۹) انجام شد به‌طور مشابه با افزایش غلظت سلول‌های سرطانی مغناطش اشباع حسگر مغناطیسی کاهش پیدا کرد. حد تشخیص و حساسیت آپتاسنگر اندازه‌گیری شد و به ترتیب مقادیر ۱۴ سلول در میلی‌لیتر و Ms/cell ۰/۱۸ به دست آمد (شکل ۵). مقادیر مغناطش اشباع و وادارندگی مغناطیسی برای هر نمونه در جدول (۴) آورده شده است.

۴- نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، حسگر مغناطیسی بر پایه میکروژل مغناطیسی که سطح آن با آپتامر اصلاح شده است برای تشخیص سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار گرفت. نانومیله‌های مغناطیسی کبالت فریت به کمک پلی‌وینیل‌الکل با موفقیت سنتز شدند. به‌منظور برهم‌کنش بهتر با آلزینات و بهبود خواص زیستی، نانومیله‌های بهینه با موفقیت با کیتوسان پوشش داده شدند. میکروژل‌های مغناطیسی در ترکیب pH متفاوت

واژه‌نامه

1. tumor phenotype
2. genetic mutation
3. epithelial cell adhesion molecule (EPCAM)
4. aptamers
5. nucleic acid
6. systematic evolution of ligands by exponential (SELEX)
7. microgel
8. poly(N-isopropylacrylamide)-co-Acrylic Acid (PNIPAM-AA)
9. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)
10. N-hydroxysuccinimide (NHS)
11. scanning electron microscopy (SEM)
12. energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS)
13. ultraviolet-visible (UV-Vis)
14. vibrating sample magnetometry (VSM)

مراجع

1. Oláh E. Basic concepts of cancer: genomic determination. *EJIFCC*. 2005; 16(2):10.
2. Hanselmann RG, Welter C. Origin of cancer: cell work is the key to understanding cancer initiation and progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022; 10: 787995. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.787995>
3. Lampignano R, Schneck H, Neumann M, Köhler D, Terstappen L, Niederacher D, Fehm T, Neubauer H. Detection of EpCAM-negative circulating tumor cells by using VyCAP filters technology. *Senologie-Zeitschrift für Mammadiagnostik und-therapie*. 2015; 12(02):A82. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1550523>
4. Deng Z, Wu S, Wang Y, Shi D. Circulating tumor cell isolation for cancer diagnosis and prognosis. *EBioMedicine*. 2022; 83:104237. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104237>
5. Dhar P, Samarasinghe RM, Shigdar S. Antibodies, nanobodies, or aptamers—which is best for deciphering the proteomes of non-model species? *International journal of molecular sciences*. 2020; 21(7):2485. <https://doi.org/10.3390/ijms21072485>
6. Safavipour M, Kharaziha M, Amjadi E, Karimzadeh F, Allafchian A. TiO₂ nanotubes/reduced GO nanoparticles for sensitive detection of breast cancer cells and photothermal performance. *Talanta*. 2020; 208:120369. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120369>
7. Pillai V, Shah D. Synthesis of high-coercivity cobalt ferrite particles using water-in-oil microemulsions. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 1996; 163 (1-2): 243-248. [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(96\)00280-6](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(96)00280-6)
8. Kurian M, Thankachan S, Nair DS, EK A, Babu A, Thomas A, et al. Structural, magnetic, and acidic properties of cobalt ferrite nanoparticles synthesised by wet chemical methods. *Journal of Advanced Ceramics*. 2015; 4:199-205. <https://doi.org/10.1007/s40145-015-0149-x>
9. Seyfoori A, Seyyed Ebrahimi S, Samiei E, Akbari M. Multifunctional hybrid magnetic microgel synthesis for immune-based isolation and post-isolation culture of tumor cells. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2019; 11(28):24945-58. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b02959>
10. Scheffold F. Pathways and challenges towards a complete characterization of microgels. *Nature Communications*. 2020; 11(1):4315. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17774-5>
11. Wang Y, Guo L, Dong S, Cui J, Hao J. Microgels in biomaterials and nanomedicines. *Advances in colloid and interface science*. 2019; 266:1-20. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.01.005>
12. Ching SH, Bansal N, Bhandari B. Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2017; 57(6):1133-52. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.965773>
13. Gheorghita Puscaselu R, Lobiuc A, Dimian M, Covasa M. Alginate: From food industry to biomedical applications and management of metabolic disorders. *Polymers*. 2020; 12 (10): 2417. <https://doi.org/10.3390/polym12102417>
14. Yao X, Zhao C, Kong J, Wu H, Zhou D, Lu X. Dopamine-assisted one-pot synthesis of zinc ferrite-embedded porous carbon nanospheres for ultrafast and stable lithium ion batteries. *Chemical Communications*. 2014; 50(93):14597-600. <https://doi.org/10.1039/C4CC07350A>
15. Seyfoori A, Ebrahimi SS, Yousefi A, Akbari M. Efficient targeted cancer cell detection, isolation and enumeration using immuno-nano/hybrid magnetic microgels. *Biomaterials science*. 2019; 7(8):3359-72. <https://doi.org/10.1039/C9BM00552H>
16. Feng R, Wang L, Zhou P, Luo Z, Li X, Gao L. Development of the pH responsive chitosan-alginate based microgel for encapsulation of *Jughans regia* L. polyphenols under simulated gastrointestinal digestion in vitro. *Carbohydrate polymers*. 2020; 250: 116917. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116917>
17. Sharma A, Hayat A, Mishra RK, Catanante G, Bhand S, Marty JL. Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂) quenching based aptasensing platform: Application to ochratoxin A detection. *Toxins*. 2015; 7(9):3771-

84. <https://doi.org/10.3390/toxins7093771>
18. Feng H, Zhao L, Bai Z, Xin Z, Wang C, Liu L, et al. Aptamer modified Zr-based porphyrinic nanoscale metal-organic frameworks for active-targeted chemo-photodynamic therapy of tumors. RSC advances. 2023; 13(16):11215-24. <https://doi.org/10.1039/D3RA00753G>