



بیست و هفتمین کنفرانس اپتیک و فوتونیک ایران و سیزدهمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران.
۱۴-۱۶ بهمن ۱۳۹۹



کد مقاله : ۱-۲۰۹۰-۱۰-A

تشخیص سلول‌های سرطانی از سلول‌های نرمال با استفاده از طیف سنجی عبوری

محمد رضا غلامی نژاد شمیرانی^۱، سعدی حسینی^۲، علی گودرزی^۱، محبوبه اسماعیل پور^۱، محمد محمدی مسعودی^{۱*}، حسین شاهسوارانی^{۲،۳}، عزالدین مهاجرانی^۴، جواد کوهسرخ^۱

^۱دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، آزمایشگاه طب بازساختی و نوآوری های زیست پزشکی، انستیتو پاستور ایران
^۲گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی،^۳ پژوهشگاه لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی
^۴[*mo.masoudi@ut.ac.ir](mailto:mo.masoudi@ut.ac.ir)

چکیده - جهت تشخیص سلول سرطانی از سلول سالم از روش همزمان عکسبرداری میکروسکوپی و طیف سنجی عبوری از نمونه‌ها در طول موج ۴۸۰ تا ۶۴۰ نانومتر در محیط *In-vitro* استفاده شده است. سلول‌های اپیتلیال سرطانی پستان (MCF-7)، سلول‌های تخمدانی همستر (Cho) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی، در این پروژه مورد استفاده قرار گرفته‌اند. پس از اندازه گیری و بررسی طیف سلول‌ها، با استفاده از توابع ریاضی بولتزمن سلول‌های تخمدانی همستر و سلول‌های سالم مزانشیمی که جزئی از سلول‌های نرمال می‌باشند از سلول‌های سرطانی تشخیص داده شدند. این روش می‌تواند با توجه به تکرارپذیری و مقرون به صرفه بودن، به عنوان روشی جایگزین برای تشخیص و بررسی سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی باشد.

کلید واژه- تشخیص سلول های سرطانی، توابع بولتزمن، سلول های نرمال، طیف سنجی، *In-Vitro*

Distinguish normal cells from cancer cells based on transmission spectroscopy

M.G. Shemirani¹, Sadi Hoseini², Ali Godarzi¹, Mahbobe Esmaeilpour¹, Mohammad Mohammadimasoudi^{1*}, Hosein Shahsavarani^{2,3}, Ezeddin Mohajerani⁴, Javad koohsorkhi

¹University of Tehran, Faculty of New Sciences and Technologies, ²Laboratory of Regenerative Medicine and Biomedical Innovations, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran, ³Department of Cellular and Molecular Sciences, Faculty of Bioscience and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, ⁴Shahid Beheshti University, Laser & Plasma Institute*mo.masoudi@ut.ac.ir

Abstract-Simultaneous microscopic imaging and a spectroscopy of biological cell in vitro environment are applied to distinguish between normal cell and cancer cell. The region of spectroscopy is between 480 to 640 nm. Breast cancer cells (MCF-7), hamster ovary cells (Cho) and mesenchymal stem cells are investigated. Hamster ovary cells and the mesenchymal stem cells can be distinguished from cancer cells by analyzing the experimental data with Boltzmann mathematical functions. This method is reproducible and cost-effectiveness. The method can be used as an alternative *In-vitro* assay to detect cancer cells.

Keywords: Boltzmann functions, Distinguish cancer cells, *In-Vitro*, Normal cells, Spectroscopy

مقدمه

استفاده از علم و فناوری فوتونیک در حوزه بیولوژی بسیار مورد توجه محققین و پژوهشگران قرار گرفته است. از جمله این تحقیقات، می‌توان تلاش برای تشخیص سریع تغییرات سلول‌ها که در زمینه‌های مختلف پزشکی از جمله داروسازی، تشخیص سرطان، سلول درمانی و استخراج سلولی بسیار مهم هستند را اشاره کرد. بیماری سرطان متأسفانه بسیاری از افراد را در جهان درگیر خود کرده و ضمن زیان‌های جانی، به دلیل پیچیدگی در سطوح ژنتیکی و فنوتیپی نیازمند روند درمانی بسیار پیچیده است [۱]. در نتیجه با توجه به اینکه تومورهای بدخیم در دهه گذشته سیر صعودی داشته [۲]، مطالعات در زمینه سرطان برای پیشرفت در تشخیص و درمان این بیماری بسیار ضروری می‌باشد، طیف سنجی نوری که تکنیک نوری بر اساس پراکندگی تابشی و مولکول‌های ارتعاشی است، گزینه مناسبی برای فراهم آوردن ترکیب‌های شیمیایی نمونه‌های زیستی بوده که می‌تواند کاربردهای بسیار کلیدی در حوزه‌های بیولوژیکی بیان کند [۳]. این تکنیک بر اساس سطح تغییرات مولکولی در سلول‌ها، بافت‌ها، مایعات و غیره توانسته در زمینه تشخیص‌های پزشکی پیشرفت‌های قابل توجهی با توجه به پتانسیل بالقوه خود، ایجاد نماید [۴]. مطالعات نشان داده که می‌توان با استفاده از فیبرهای نوری اختصاصی برای اندازه‌گیری تغییرات به صورت پیوسته و مانیتورینگ آن در واحد زمان روی نمونه‌های مختلف در شرایط آزمایشگاهی بهره برد. از جمله این موارد می‌توان به کاربردهای این دانش در زمینه مطالعات بر روی سرطان اشاره کرد [۵]. Kirsch و همکاران [۶] با کمک طیف سنجی، قادر به تشخیص تغییرات توموری سرطان ایجاد شده در قشر مغزی موش‌ها شدند. گروه ما در این تحقیق با استفاده از تصویر برداری همزمان میکروسکوپی و طیف سنجی بر روی سلول‌های اپیتلیال سرطانی پستان (MCF-7)، سلول‌های تخمدانی

همستر (Cho) و همچنین سلول‌های مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی انسانی، در شرایط یکسان آزمایشگاهی، اقدام به بررسی و مقایسه بین نتایج خروجی کرده، که تفاوت بین سلول‌های سرطانی با سلول‌های نرمال با توجه به نتایج آنالیز داده و استفاده از توابع ریاضی بولتزمن مشخص گردید.

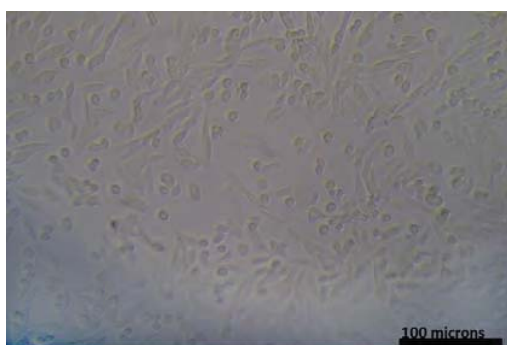
تحقیق و آزمایش

در این تحقیق رده‌های سلولی سلول‌های اپیتلیال سرطانی پستان (MCF-7)، سلول‌های تخمدانی همستر (Cho) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. همچنین سلول‌های مزانشیمی از نمونه چربی انسانی با روش آنژیمی در انستیتو پاستور ایران استخراج گردید. در ادامه سلول‌ها در فلاسک‌های T25 با محیط کشت DMEM-F12 غنی‌شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fatal Bovine Serum-FBS)، ۲ میلی‌مولار گلوتاماکس، یک درصد آنتی‌بیوتیک‌پنی‌سیلین - استرپتومایسین در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی‌اکسید کربن کشت داده شد. برای انجام تست‌های آزمایشگاهی از پاساژ ۲ و ۴ از سلول‌ها استفاده گردید. در این آزمایش، تعداد مشخصی از سلول‌ها به میزان 5×10^4 سلول داخل هر چاهک از پلیت چهار خانه کشت داده شد که بعد از بازه زمانی ۴۸ ساعت، زمانی که تراکم سلول به ۷۰ درصد سطح پلیت رسید برای طیف‌سنجی آماده و مورد بررسی قرار گرفت.

با استفاده از تصویربرداری همزمان میکروسکوپی برای صحت سنجی اطلاعات [۷] و طیف سنجی با اسپکترومتر HR4000 ساخت شرکت Ocean Optics برای بررسی دقیق اینکه در کدام منطقه از محیط کشت سلول و مقدار تراکم سلول‌ها هستیم، پس از بهره‌گیری از منبع نوری ۴۸۰ تا ۶۴۰ نانومتر [۸] برای بررسی نمونه کنترل در ابتدا از فلاسک سلولی به همراه محیط کشت کامل و فلاسک



شکل ۳: تصویر میکروسکوپی گرفته شده از سلول‌های اپیتلیال سرطانی پستان



شکل ۴: تصویر میکروسکوپی گرفته شده از سلول‌های تخمدانی همستر

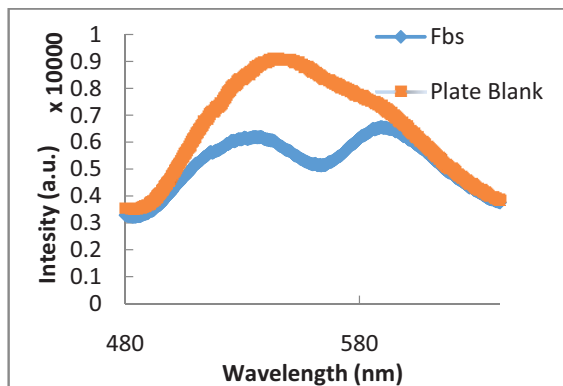
پس از بررسی داده‌ها، به جهت مشهود شدن تفاوت بین منحنی و تحلیل داده‌ها از تابع توزیع بولتزمن (معادله شماره ۱) استفاده شد. ضرائب تابع بولتزمن در جدول شماره ۱ و نمودار حاصله در شکل شماره ۵ ترسیم شده است.

$$(y = A2 + (A1 - A2)/(1 + \exp((x - x0)/dx)) \quad (1)$$

Model	Boltzmann			
	mcf7	fbf	msc	cho
A1	7726.04 ± 85.06	6555.48 ± 93.66	8017 ± 235.75	2694.08 ± 159.63
A2	2647.22 ± 124.08	2635.82 ± 107.88	2681.28 ± 142.23	2647.22 ± 124.08
X0	604.52 ± 1.46	590.50 ± 1.87	551.58 ± 2.46	557.81 ± 2.21
dx	9.99 ± 1.27	9.99 ± 1.63	9.99 ± 2.14	9.99 ± 1.93

جدول ۱: ضرائب تابع بولتزمن طیف عبوری نمونه‌ها

سلولی خالی (شکل ۱) به دلیل مشترک بودن در تمام نمونه‌ها، عکسبرداری و طیف سنجی شد.



شکل ۱: نمودار طیف عبوری محیط کشت کامل Fbs که فاقد هر گونه سلول و دارای مواد مغذی برای سلول بوده (رنگ آبی) و محیط کشت خالی که فاقد هرگونه ماده است (رنگ نارنجی).

عکسبرداری و طیف سنجی عبوری از سلول‌های اپیتلیال سرطانی پستان، سلول‌های تخمدانی همستر، سلول‌های مزانشیمیو همچنین محیط کشت کامل انجام شد. شکل ۲ تا ۴ تصویر میکروسکوپی این سلول‌ها را نشان می‌دهد و نمودار طیف عبوری این نمونه‌ها در شکل شماره ۵ به نمایش درآمده است.

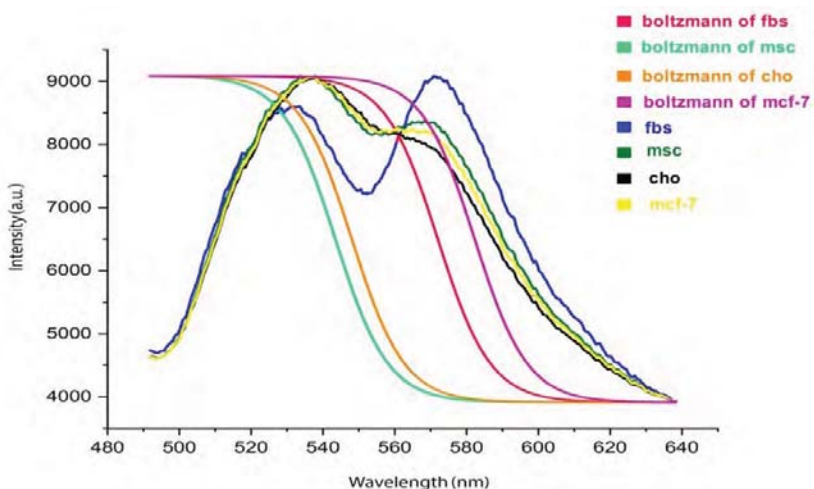


شکل ۲: تصویر میکروسکوپی گرفته شده از سلول‌های مزانشیمی

تشخیص داد. در این روش اگرچه سلول‌های سالم با هم یکی نیستند ولی رفتارشان مشابه یکدیگر بوده و با سلول‌های سرطانی متفاوتند و این تفاوت در طول موج 580° نانومتر مشهودتر است. این روش با توجه به سادگی و هزینه پایین می‌تواند به عنوان جایگزین و یا مکمل سایر روش‌های بیولوژیکی برای تشخیص سلول‌های سرطانی در محیط آزمایشگاهی باشد که در بازه زمانی کم و با دقت بالا برای سلول‌های درون محیط کشت با تراکم سلولی مناسب در محیط 50° میکرومتر مربعی مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

برای اطمینان از تکرارپذیری، هر آزمایش سه مرتبه تکرار شد. ضمن اینکه از فلاسک‌های دیگری که دارای محتویات سلولی یکسان با آزمایش بودند، بررسی به عمل آمده و همگی دارای پاسخ یکسان با آزمایش فعلی بوده و خطایی مشاهده نشد. با توجه به نمودارهای حاصله از توابع بولتزمن در شکل ۵، که نمودار سلول‌های سالم دارای تفاوت مشهود با سلول‌های سرطانی بودند، مشخص گردید با بهره بردن از شدت طیف عبوری می‌توان سلول‌های سرطانی را از سلول‌های نرمال در شرایط آزمایشگاه



شکل ۵: طیف عبوری نمودار تابع بولتزمن سلول‌ها

مرجع‌ها

- Clinical Gastrointestinal Endoscopy[¶]," *Photochemistry and photobiology*, vol. 72, no. 1, pp. 146-150, 2000.
- [6] M. Kirsch, G. Schackert, R. Salzer, and C. Krafft, "Raman spectroscopic imaging for in vivo detection of cerebral brain metastases," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 398, no. 4, pp. 1707-1713, 2010.
- [7] M. Loyez *et al.*, "Rapid detection of circulating breast cancer cells using a Multiresonant optical fiber Aptasensor with plasmonic amplification," *ACS sensors*, vol. 5, no. 2, pp. 454-463, 2020.
- [8] Z. Nie *et al.*, "Optical Biopsy of the Upper GI Tract Using Fluorescence Lifetime and Spectra," *Frontiers in Physiology*, vol. 11, p. 339, 2020.
- [1] K. B. Sutradhar and M. Amin, "Nanotechnology in cancer drug delivery and selective targeting," *International Scholarly Research Notices*, vol. 2014, 2014.
- [2] D. Viktor *et al.*, "Optical percutaneous needle biopsy of the liver: a pilot animal and clinical study," *Scientific Reports (Nature Publisher Group)*, vol. 10, no. 1, 2020.
- [3] C. De Grauw, C. Otto, and J. Greve, "Line-scan Raman microspectrometry for biological applications," *Applied spectroscopy*, vol. 51, no. 11, pp. 1607-1612, 1997.
- [4] M. Okuno and H.-o. Hamaguchi, "Multifocus confocal Raman microspectrometry for fast multimode vibrational imaging of living cells," *Optics letters*, vol. 35, no. 24, pp. 4096-4098, 2010.
- [5] M. G. Shim, L. M. Wong Kee Song, N. E. Marcon, and B. C. Wilson, "In vivo Near-infrared Raman Spectroscopy: Demonstration of Feasibility During