



## Isolation of B Cells Using Magnetic Nanoparticles and Investigating the Effect of Cell Staining and the Amount of Nanoparticles on their Isolation

A. H. Haghighi

Assistant Professor of Biomedical Engineering, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Email: Haghighi.amirhossein@iau.ac.ir

### Abstract

Today, magnetic nanoparticles and microparticles are used in various medical and therapeutic applications such as MRI, tissue repair, drug delivery, hyperthermia, and cell isolation. One of the most important cells to isolate are lymphoid cells, because they play a very important role in the treatment of lymphoma cancers and immunotherapy. Therefore, in this study, B cells were isolated from PBMCs using iron oxide magnetic nanoparticles coated with pectin. In order to isolate B cells, FITC anti-human CD20 antibody was attached to nanoparticles using EDC/NHS and analyzed by flow cytometry. In the next step, the target cells are separated from others cells with nanoparticles containing antibodies, and the rate of isolation is checked by flow cytometry. The results of flow cytometry show that the antibody is attached to the nanoparticles and its MFI is equal to 55. It was also found that by staining the cells after isolation, the reaction efficiency is somewhat reduced from 81% to 76% compared to the state without staining and direct analysis of the cells after washing by flow cytometry. In addition, the results showed that the appropriate amount of nanoparticles in the reaction with cells is 50 microliters and its reduction causes a 30% loss in the separation efficiency.

Received: 28 September 2023

Accepted: 29 January 2024

Page Number: 131-145

### Keywords:

Magnetic Nanoparticles,  
Pectin,  
B Cells,  
Flow Cytometry Test

Please Cite this Article Using:

Haghighi, A. H. (2025). Isolation of B Cells Using Magnetic Nanoparticles and Investigating the Effect of Cell Staining and the Amount of Nanoparticles on their Isolation. *Iranian Chemical Engineering Journal*, 23(136), 131-145, [In Persian].



# جداسازی سلول‌های B با استفاده از نانوذرات مغناطیسی و بررسی اثر رنگ آمیزی سلول‌ها و مقدار نانوذرات بر جداسازی آن‌ها

امیرحسین حقیقی

استادیار مهندسی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران

پیام‌نگار: Haghghi.amirhossein@iau.ac.ir

## چکیده

امروزه از نانوذرات و میکروذرات مغناطیسی در کاربردهای مختلف پزشکی و درمان مانند MRI، ترمیم بافت، رهایش دارو، هایپرترمی و جداسازی سلول‌ها استفاده می‌شود. یکی از مهم‌ترین سلول‌هایی که باید جداسازی شود، سلول‌های لنفاوی است؛ زیرا نقش بسیار مهمی در درمان سرطان‌های لنفوم و ایمنوتراپی دارد. لذا، در این مطالعه سلول‌های B از PBMCs با استفاده از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن پوشش داده شده با پکتین جدا شده است. به منظور جداسازی هدفمند سلول‌های B، آنتی‌بادی FITC anti-human CD20 با استفاده از EDC/NHS به نانوذرات، متصل و با فلوسایتومتری آنالیز شده است. در مرحله بعد، سلول‌های B با نانوذرات حاوی آنتی‌بادی از بقیه سلول‌ها جدا و با فلوسایتومتری بازده جداسازی بررسی شده است. نتایج فلوسایتومتری نشان می‌دهد که آنتی‌بادی به نانوذرات متصل شده و میزان MFI آن برابر با ۵۵ است. بازده جداسازی سلول‌ها ۷۵ تا ۸۲ درصد است. همچنین، مشخص شد که با رنگ‌آمیزی سلول‌ها بعد از جداسازی، میزان بازده واکنش تا حدودی نسبت به حالت بدون رنگ‌آمیزی و آنالیز مستقیم سلول‌ها بعد از شست‌وشو با فلوسایتومتری از ۸۱ درصد به ۷۶ درصد کاهش می‌یابد. علاوه بر این، نتایج نشان داد که مقدار مناسب نانوذرات در واکنش با سلول‌ها ۵۰ میکرولیتر است و کاهش آن موجب کاهش ۳۰ درصدی در بازده جداسازی می‌شود.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۹

شماره صفحات: ۱۳۱ تا ۱۴۵

## کلیدواژه‌ها:

نانوذرات مغناطیسی،

پکتین،

سلول‌های B،

آزمایش فلوسایتومتری

\* شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، دانشکده مهندسی، گروه مهندسی پزشکی

استناد به مقاله:

حقیقی، امیرحسین. (۱۴۰۳). جداسازی سلول‌های B با استفاده از نانوذرات مغناطیسی و بررسی اثر رنگ‌آمیزی سلول‌ها و مقدار نانوذرات بر جداسازی آن‌ها، نشریه مهندسی شیمی ایران، ۲۳(۱۳۶)، ۱۳۱-۱۴۵.

امروزه نانوذرات و میکروذرات در کاربردها و علوم مختلفی به کار می‌رود [۱-۳]، اما در بین آن‌ها، نانوذرات مغناطیسی<sup>۱</sup> به دلیل کاربردهای فراوان خود در سیالات مغناطیسی، کاتالیست‌ها، بیوتکنولوژی/زیست پزشکی<sup>۲</sup>، ذخیره اطلاعات و جداسازی عناصر مضر و حفظ محیط زیست، بسیار محل توجه پژوهشگران قرار گرفته است [۴-۷]. در میان نانوذرات مغناطیسی، نانوذرات اکسید آهن با ویژگی سوپرپارامگناطیس<sup>۳</sup> (SPIO) به صورت گسترده در کاربردهای داخل بدن، همانند: MRI<sup>۴</sup>، ترمیم بافت‌ها، ایمونواسی<sup>۵</sup>، سم‌زدایی از مایعات بیولوژیک، هایپرترمی<sup>۶</sup> (درمان و به‌عنوان مثال از بین بردن سلول‌های سرطانی با استفاده از حرارت ناشی از نوسان ذرات مغناطیسی)، دارورسانی، جداسازی انواع سلول‌ها و بسیاری دیگر از موارد، استفاده می‌شود [۸-۱۳]. از جمله ویژگی‌هایی که سبب شده تا در کاربردهای فراوان پزشکی و زیستی به کار رود، می‌توان به موارد زیر اشاره کرد [۱۴]:

- ۱- قابلیت ساخت نانوذرات در اندازه‌های متفاوت متناسب با کاربرد و هدف مورد نظر و با روش‌های مختلف.
- ۲- اصلاح سطحی آن با مولکول‌های بیولوژیکی، مانند انواع آنتی‌بادی‌ها و پروتئین‌ها به منظور اتصال هدفمند.
- ۳- امکان جداسازی و کنترل آن از راه میدان مغناطیسی خارجی.
- ۴- خاصیت سوپرپارامگناطیس که سبب می‌شود در صورت حذف میدان مغناطیسی خارجی و در صورتی که هیچ نیروی مغناطیسی در بین ذرات وجود نداشته باشد، هم‌چنان دارای ثبات و پراکندگی مناسب باشد.

اما نکته مهمی که در مورد نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن وجود دارد، این است که حتماً باید یک پوشش روی سطح آن قرار گیرد تا آبدوست شود و برای کاربردهای بیولوژیک قابل استفاده شود؛ این پوشش باید غیرسمی و زیست‌سازگار باشد [۱۵، ۱۶]. در مطالعه قبلی انجام شده، انواع پوشش‌ها و برتری‌ها و کاستی‌های آن توضیح داده شده است [۱۷]. طبیعت این پوشش‌های سطحی و هم‌چنین آرایش هندسی ساختار آن‌ها، نقش بسیار مهمی در بیوتکنیک و توزیع

زیستی<sup>۷</sup> این نانوذرات در بدن ایفا می‌کند. نوع پوشش و مشتقات آن که برای نانوذرات استفاده می‌شود، به کاربرد پایانی آن‌ها وابسته است و باید با توجه به کاربردی که از آن‌ها مد نظر است، استفاده و انتخاب شوند [۱۸، ۱۹]. مواد مختلفی برای اصلاح سطحی آن‌ها استفاده می‌شود که یکی از پرکاربردترین آنها مواد پلیمری طبیعی و مصنوعی است. در بین پلیمرهای طبیعی، پکتین یکی از مهمترین پلی‌ساکاریدها است که برای سال‌های زیادی در صنایع غذایی و دارویی- به دلیل قیمت مناسب و زیست‌سازگاری- استفاده می‌شود. ساختار شیمیایی پکتین- چون از مولکول‌های طبیعی مثل انواع قند و گلاکتورونیک اسید<sup>۸</sup> تشکیل شده است- بسیار پیچیده است. زنجیر پکتین نیز از دو بخش، قسمت‌های صاف با گروه‌های آنیونی و قسمت‌های شاخه‌ای یا شانه‌ای با گروه‌های غیر آنیونی تشکیل شده است. ترکیبات مختلف در پکتین دارای گروه‌های عاملی متفاوتی مانند هیدروکسیل، آمید و کربوکسیل است. همه این ویژگی‌ها باعث شده تا پکتین یک ماده بی‌همتا محسوب و در کارهای بیولوژیکی مختلف استفاده شود [۲۰]. لذا، در این مطالعه نانوذرات با پکتین پوشش داده شده تا زیست‌سازگار شود و امکان اتصال آنتی‌بادی به آن فراهم و از کلوخه شدن آن جلوگیری شود.

چنان‌که رفت، یکی از مهم‌ترین کاربردهای نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده در شناسایی سلول‌ها و جداسازی آن‌ها است. به عنوان مثال، در مطالعه‌ای به جداسازی سلول‌های T با استفاده از نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده و سامانه مکس (MACS) پرداخته و هم‌چنین اثر حضور نانوذرات در تکثیر و تقسیم سلولی در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است [۲۱]. در مطالعه دیگری سلول‌های سرطانی موجود در خون (CTCs)<sup>۹</sup> با استفاده از نانوسیم‌ها جداسازی شده است [۲۲]. در پژوهشی دیگر، به شناسایی و جداسازی عوامل بیماری، مانند باکتری‌های بیماری‌زا با استفاده از نانوذرات مغناطیسی پوشش داده شده با کلاژن به عنوان یک روش با توانایی پاسخ‌دهی سریع نسبت به روش‌های رایج پرداخته شده است [۲۳]. هم‌چنین، از کارهای انجام شده در جداسازی سلول‌های B و T می‌توان به تحقیق تاکاشی و همکارانش<sup>۱۰</sup> اشاره کرد [۲۴]. آنان این

7. Biodistribution  
8. Galacturonic Acid and Different Neutral Sugars  
9. Circulating Tumor cIIs  
10. Takahashi et al.

1. Magnetic Nnparticles  
2. Biotechnology/Biomedicine  
3. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles  
4. Magnetic Resonance Imaging  
5. Immunoassay  
6. Hyperthermia

CD19 دو نقش اصلی را در سلول‌های B انسان ایفا می‌کند؛ نخست، به‌عنوان تنظیم‌کننده برای جذب پروتئین‌های سیگنال‌دهندهٔ سیتوپلاسمی<sup>۳</sup> به غشا عمل می‌کند. دوم، در کمپلکس CD19/CD21 مسیرهای سیگنال‌دهی گیرندهٔ سلول بی<sup>۴</sup> را کاهش می‌دهد [۲۹،۳۰]. بنابراین، شناسایی و جداسازی سلول‌های B بیان‌کنندهٔ مارکر CD19 از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. لذا، هدف این پژوهش، اصلاح سطحی نانوذرات مغناطیسی با پکتین و استفاده از آن در جداسازی یا غنی‌سازی<sup>۵</sup> سلول‌های B با استفاده از آنتی‌بادی FITC anti-human CD20 است.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲-۱ مواد

نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن مگنتیت<sup>۶</sup> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) به‌صورت آماده از شرکت آمریکایی نانومتریال<sup>۷</sup> با پوششی از جنس پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) به‌میزان یک درصد و با خلوص بالای ۹۸ درصد و پکتین با وزن مولکولی بین ۳۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ gr/mol از شرکت هندی لوبا<sup>۸</sup> خریداری شد. N- هیدروکسی سوکسین ایمید<sup>۹</sup> (NHS) با خلوص ۹۸ درصد و N - (۳- آمینوپروپیل) - N' - اتیل کربودی بایمید هیدروکلراید<sup>۱۰</sup> (EDC) از شرکت سیگما آلدریج تهیه شد. آنتی‌بادی ضد مارکر CD19 انسانی نشان‌دار شده با فلوروکروم یا رنگ PE<sup>۱۱</sup> (PE anti-human CD19) با غلظت آن 200 µg/ml از شرکت بایولجنس<sup>۱۲</sup> خریداری شد. آنتی‌بادی ضد مارکر CD20 انسانی نشان‌دار شده با رنگ FITC<sup>۱۳</sup> (FITC anti-human CD20) با غلظت ۰/۶ mg/ml از شرکت رشد تهیه شد.

### ۲-۲ آزمایش‌ها

برای مشخص کردن خواص مغناطیسی نانوذرات از دستگاه مغناطیس سنج ارتعاشی (VSM<sup>۱۴</sup>) ساخت شرکت مغناطیس دانش‌پژوه کاشان

سلول‌ها را از PBMC<sup>۱</sup> و خون به‌وسیلهٔ باکتری‌های BacMPs جدا کرده‌اند. لازم به ذکر است که این باکتری‌ها از رسوبات دریایی جدا شده و به‌دست می‌آیند و خاصیت مغناطیسی دارند. در این مطالعه، ابتدا پروتئین G را به ذرات BacMPs متصل کرده‌اند، سپس آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن مارکر سلول هدف را به آن متصل کرده و در نهایت، پس از جداسازی با فلوسایتومتری آنالیز کرده‌اند. نتایج نشان می‌دهد که میزان جداسازی هر کدام از سلول‌های B و T از PBMC بیش از ۹۵ درصد بوده‌است. علاوه‌بر این، مدت زمان جداسازی کمتر از یک‌سوم زمان لازم نسبت به روش‌های رایج- مانند استفاده از سانتریفیوژ- است. آنان با توجه به نتایج خوب عملکرد این ذرات بیان کردند که جداسازی انواع سلول‌های ایمنی با استفاده از ذرات G-BacMPs متصل‌شده به مونوکلونال آنتی‌بادی امکان‌پذیر است [۲۴]. از جمله پژوهش‌های انجام‌شده در زمینهٔ جداسازی سلول‌ها می‌توان به کار ژو و همکارانش<sup>۲</sup> اشاره کرد. در این تحقیق، آنان به جداسازی سلول‌های سرطان پستان نوع SK-BR3 با استفاده از نانوذرات اکسید آهن اصلاح‌شده با آنتی‌بادی، تحت یک میدان مغناطیسی اقدام کرده‌اند. آنان توانایی نانوذرات حاوی آنتی‌بادی را در اتصال به سلول‌های سرطانی در خون تازهٔ انسان بررسی کردند و موفق شدند تا به بازده ۸۶ درصد در جداسازی سلول‌های سرطانی دست یابند [۲۵]. در یکی دیگر از مطالعات، سلول‌های سرطان سینه با استفاده از نانوذرات مغناطیسی پوشش داده شده با سیلان و حاوی آنتی‌بادی هرسپتین، از خون جدا شد و بازده ۹۰ درصدی در جداسازی سلول‌ها از بقیهٔ سلول‌ها به‌دست آمد [۲۶].

یکی از مهم‌ترین سلول‌های پرترفدار برای جداسازی، سلول‌های لنفاوی است؛ چراکه در درمان سرطانی‌های لنفاوی و ایمونوتراپی نقش بسیار مهمی دارد [۲۱،۲۷،۲۸]. در این میان، سلول‌های B بیان‌کنندهٔ مارکر CD19 و CD20 محل توجه است، چراکه تقریباً در سطح ۹۹ درصد سلول‌های B نرمال و نئوپلاست یافت می‌شود و از آن در تشخیص لنفوم‌های سلول B یا تومورهای سرطانی و ایمونوتراپی استفاده می‌شود. CD19 مولکول پروتئینی است که در توسعه، فعال‌سازی و تمایز سلول‌های B نقش دارد. جهش در این پروتئین موجب بروز سندرم‌های نقص ایمنی شدید، مانند HIV می‌شود که مشخصهٔ آن‌ها، کاهش تولید آنتی‌بادی است [۲۹،۳۰].

1. Peripheral Blood Mononuclear cClls  
2. Xu et al.

3. Cytoplasmic Signaling Proteins  
4. B cell Receptor Signaling Pathways  
5. Enrichment  
6. Magnetite  
7. US Research Nanomaterials  
8. Loba Chemie  
9. N-Hydroxysuccinimide  
10. N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'- Ethyl Carbodiimide Hydrochloride  
11. R-phycoerythrin  
12. BioLegend  
13. Fluorescein Isothiocyanate  
14. Vibrating-Sample Magnetometer

۵۰ mM مس بافر (به‌عنوان بافر فعال‌کننده<sup>۴</sup>) شست‌وشو داده می‌شود. سپس محلول روی لوله آزمایش (لوله اپندورف) خالی و حجم آن به ۱۵۰ میکرولیتر کاهش داده می‌شود. مقدار ۰/۶ میلی‌گرم NHS در مس بافر حل و به نانوذرات اضافه می‌شود. پس از آن، مقدار ۰/۴ میلی‌گرم EDC نیز در ۳۰ تا ۵۰ میکرولیتر مس بافر حل و به محلول نانوذره اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه روی همزن (شیکر) لوله‌ای قرار داده می‌شود تا گروه‌های عاملی نانوذره فعال شوند. سپس، نانوذرات فعال‌شده، با 1x PBS (به‌عنوان بافر اتصال‌دهنده<sup>۵</sup>) شست‌وشو داده می‌شود. در مرحله بعد، ۱۵۰ میکرولیتر آنتی‌بادی (معادل ۹۰ میکروگرم) FITC anti-human CD20، به محلول نانوذرات شست‌وشو داده شده، اضافه و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت، روی همزن لوله‌ای گذاشته می‌شود. اگر پس از افزودن آنتی‌بادی کلوخه تشکیل شد، پیش از گذاشتن بر روی همزن لوله‌ای، مواد با همزن فراصوت پخش می‌شود. پس از این‌که اتصال به‌خوبی انجام گرفت، محلول ۱ درصد گلیاسین<sup>۶</sup> (حل‌شده در آب) به آن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی همزن لوله‌ای قرار داده و پس از آن، لوله واکنش بر روی آهن‌ربای مغناطیسی گذاشته و محلول روی آن تخلیه می‌شود. از نو، یک میلی‌لیتر گلیاسین به لوله واکنش اضافه و مرحله قبل و شست‌وشو با گلیاسین تکرار می‌شود؛ به عبارتی یعنی دو مرحله شست‌وشو با گلیاسین انجام می‌شود. هدف از استفاده از گلیاسین، کاهش اتصالات غیر اختصاصی و فعالیت گروه‌های غیر مرتبط است. در نهایت، دو مرتبه با یک میلی‌لیتر 1x PBS شست‌وشو داده و در یک میلی‌لیتر بافر نگهدارنده قرار داده می‌شود. بافر نگهدارنده شامل ۹۹/۹ درصد 1x PBS (۱۰۰ ml)، ۰/۱ درصد FBS (۰/۱ میلی‌لیتر) و ۰/۰۵ گرم سدیم آزاید است.

#### ۲-۳-۳ روش بررسی اتصال آنتی‌بادی به نانوذرات

برای بررسی اتصال آنتی‌بادی FITC anti-human CD20 به نانوذرات پوشش داده شده با پکتین، ابتدا نانوذرات دارای آنتی‌بادی با غلظت ۱ mg/ml در حمام یخ و با ولتاژ پایین (بین ۲۰ تا ۳۰) و به صورت پالسی با همزن فراصوت پخش می‌شود تا کاملاً همگن شود. سپس، مقدار ۳۰ میکرولیتر از نانوذره حاوی آنتی‌بادی به‌درون لوله

در دمای اتاق و تحت میدانی به‌قدرت ۱۰ کیلواورستد (KOE<sup>۱</sup>) استفاده شد. از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM<sup>۲</sup>) برای بررسی پوشش‌دهی نانوذرات با پکتین و از دستگاه Philips EM208S 100KV ساخت کشور هلند استفاده شد. آزمایش فلوسایتومتری برای بررسی اتصال آنتی‌بادی به نانوذرات و نیز شناسایی و جداسازی سلول هدف از بقیه سلول‌ها استفاده شد. در همین راستا از دستگاه A BD FACS Calibur ساخت آمریکا برای آزمایش فلوسایتومتری استفاده شد. هم‌چنین برای پخش کردن نانوذرات در محیط از هم‌ژنایزر فراصوت مدل HD3200 شرکت بندلین<sup>۳</sup> آلمان استفاده شد.

#### ۲-۳-۲ روش‌ها

##### ۲-۳-۱ روش پوشش‌دهی نانوذرات با پکتین

برای تهیه نانوذرات مغناطیسی بر پایه Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> با پکتین، ابتدا محلول ۳/۳٪ پکتین در آب تهیه می‌شود (یک گرم پکتین در ۳۰ ml آب حل می‌شود). برای تهیه این محلول، پس از اضافه کردن پکتین به آب آن را به مدت ۴ ساعت روی همزن قرار داده و پخش می‌شود. پس از آن، نانوذرات خریداری شده با غلظت ۵ mg/ml به‌وسیله سرنگ، آرام‌آرام به محلول از قبل آماده‌شده پکتین اضافه می‌شود. به مدت ۴h روی همزن با دور ۳۰۰ تا ۴۰۰ قرار داده می‌شود تا پوشش‌دهی انجام گیرد. هم‌چنین، در طول زمان پوشش‌دهی، بررسی و با همزن فراصوت پخش می‌شود تا کلوخه‌های احتمالی از بین برود (طی دو دقیقه در ولتاژ پایین با همزن فراصوت پخش می‌شود). در انتها و پس از گذشت زمان پوشش‌دهی، بشر و محلول واکنش روی آهن‌ربای مغناطیسی گذاشته می‌شود تا نانوذرات رسوب کنند، سپس محلول فوقانی آن دور ریخته و با سرنگ (به سرعت و با فشار) چند میلی‌لیتر آب به آن اضافه می‌شود تا پکتین اضافی حذف شود. سپس، به‌همین ترتیب چندین مرحله (۲ یا ۳ بار) با آب شست‌وشو داده می‌شود. پس از شست‌وشو، نانوذرات پوشش داده شده با پکتین در بافر 1x PBS گذاشته می‌شود.

##### ۲-۳-۲ روش اتصال آنتی‌بادی به نانوذرات پوشش‌دهی شده با پکتین

ابتدا، مقدار ۲ میلی‌گرم نانوذره پوشش داده شده با پکتین، در

4. Activation Buffer  
5. Coupling Buffer  
6. Glycine

1. Kilo Oersted  
2. Transmission Electron Microscopy  
3. Bandelin

فلوسایتومتتری ریخته می‌شود. لازم به ذکر است که ۲ لوله فلوسایتومتتری آنالیز می‌شود؛ یکی، لوله نانوذرات حاوی آنتی‌بادی به‌عنوان نمونه آزمایش و دومی، نانوذرات فاقد آنتی‌بادی به‌عنوان نمونه کنترل، تا با یکدیگر مقایسه شوند. به هر دو لوله ۲۵۰ تا ۳۵۰ میکرولیتر 1x PBS اضافه و با دستگاه همگن‌کننده<sup>۱</sup> مخلوط و با دستگاه فلوسایتومتتری آنالیز می‌شود.

### ۲-۳-۴ روش جداکردن لنف از خون

برای جداکردن لنف‌ها یا سلول‌های تک‌هسته‌ای (PBMCs) از خون، ابتدا از اهداکننده سالم، خون‌گیری و با مقدار یکسانی از محلول فایکول<sup>۲</sup> مجاور می‌شود، به‌گونه‌ای که خون و فایکول با هم مخلوط نشوند. در مرحله بعد، لوله فایکول حاوی خون در دور ۱۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه و در شرایط شروع و توقف بدون ترمز<sup>۳</sup> سانتریفیوژ می‌شود. پس از توقف سانتریفیوژ، قسمت حاوی لنف‌ها جدا می‌شود و ابتدا با ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت و سپس با 1x PBS و با سانتریفیوژ و در دور ۳۰۰ g شست‌وشو می‌شود. در نهایت، سلول‌ها یا لنف‌ها با تریپان بلو و لام نئوبار شمارش و به‌مقدار مورد نیاز برای واکنش استفاده می‌شود.

### ۲-۳-۵ روش جداکردن سلول‌های هدف از لئوسیت‌ها با استفاده از نانوذرات دارای آنتی‌بادی

در ابتدا نانوذرات حاوی آنتی‌بادی با غلظت ۱ mg/ml در حمام آب یخ و به‌صورت پالسی با همزن فراصوت<sup>۴</sup> پخش می‌شود. سپس، نیم‌میلیون PBMC به مدت ۱/۵ ساعت با ۵۰ میکرولیتر نانوذرات حاوی آنتی‌بادی مخلوط و لوله واکنش بر روی همزن لوله‌ای گذاشته می‌شود تا واکنش بین نانوذرات و سلول‌های هدف یا سلول‌های B انجام شود. در مرحله بعد، سلول‌های واکنش‌ن داده از محیط واکنش شست‌وشو داده می‌شود.

شست‌وشو در سه مرحله با 1x PBS یا مکس بافر صورت گرفت. در هر مرحله، یک میلی‌لیتر 1x PBS به لوله واکنش اضافه شد، با دستگاه همگن‌کننده همزده و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه بر روی آهن‌ربای مغناطیسی گذاشته شد تا نانوذرات کاملاً رسوب کنند.

1. Vortex Mixer
2. FicoLEX
3. Soft Start and Soft Stop
4. Ultrasonic Homogenizer

سپس، مایع رویی با کمک آهن‌ربا جدا و یا دور ریخته می‌شود. دو بار دیگر شست‌وشو انجام شد و در نهایت، ۱۰۰ میکرولیتر 1x PBS به مخلوط واکنش اضافه و مخلوط نهایی از لوله اپندورف به لوله فلوسایتومتتری انتقال داده و رنگ‌آمیزی شد.

در رنگ‌آمیزی به همه لوله‌ها (آزمایش و کنترل)، مقدار ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی PE anti-human CD19 اضافه شد، با دستگاه همگن‌کننده همزده شده و به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در جای تاریک قرار داده شد. پس از آن، لوله‌های رنگ‌شده با ۲ ml محلول 1x PBS و با سانتریفیوژ شست‌وشو داده شد. سپس، به هر کدام از لوله‌ها ۳۰۰ μl از 1x PBS اضافه و با دستگاه فلوسایتومتتری آنالیز شد.

مطابق جدول (۱)، در هر واکنش یک لوله کاملاً مشابه با لوله اصلی و با همان تعداد سلول و نانوذره تهیه و به‌عنوان لوله کنترل استفاده شد تا در آنالیز نتایج به‌کار رود. تنها تفاوت لوله کنترل با لوله اصلی این است که روی آهن‌ربای مغناطیسی برای رسوب نانوذرات قرار داده نمی‌شود؛ یعنی شست‌وشو داده نمی‌شود، ولی رنگ‌آمیزی می‌شود.

### ۳. نتایج و بحث

#### ۳-۱-۱ آزمایش VSM نانوذرات خالص و پوشش داده شده

همان‌طور که در مقدمه بیان شد، برای زیست‌سازگاری و جلوگیری از کلوخه شدن نانوذرات، حتماً باید نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن پوشش داده شود. در این پژوهش، از پکتین - به دلیل خواص خوب - استفاده شد. در مطالعات مختلف از مقادیر مختلفی از پکتین از ۰/۴ درصد وزن به حجم تا درصد‌های بالا و متناسب با روش سنتز استفاده شده است [۳۱-۳۳]. در یک روش ممکن است نانوذرات در محلول پکتین تولید شود و یا در روش دیگری بعد از سنتز نانوذرات و در مرحله دوم با پکتین پوشش داده شود. مثلاً در مطالعه‌ای، پس از سنتز نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> با پکتین پوشش داده شده و برای هایپرترما و از بین بردن سلول‌های سرطانی با افزایش دما استفاده شده است [۳۴،۳۵]. یا در مطالعات دیگر، تولید نانوذرات در محلول پکتین انجام شده و هم‌زمان با تشکیل نانوذرات، پوشش نیز داده شده است [۳۶،۳۷]. در این پژوهش، نانوذرات به‌صورت جداگانه پوشش داده شده است؛ زیرا خریداری شده و سنتز نشده‌اند.

جدول ۱. ویژگی‌های لوله‌های آزمایش و کنترل در واکنش بین سلول‌ها با نانوذرات حاوی آنتی‌بادی.

Table 1. Characteristics of test and control tubes in the reaction between cells with nanoparticles containing antibodies.

Tube	Washing	Stained with PE anti-human CD19	Amount of nanoparticles with concentration 1mg/mL	Reaction volume (μL)
Test	washed	Done	30 μL	20 ± 110
Control	Not washed	Done	30 μL	20 ± 110

پارامغناطیسی و نزدیک به سوپرپارامغناطیسی آن است؛ چراکه نسبت تراکم<sup>۱</sup> که از تقسیم مقدار پسماند مغناطیسی (Mr) به مقدار مغناطیس اشباع (Ms) به دست می‌آید، برای نانوذرات پوشش داده شده برابر با ۰/۱۱ است و هرچقدر این نسبت کوچک‌تر باشد، خاصیت مغناطیسی آن بیشتر است و ماده‌ای که نسبت تراکم آن برابر با صفر باشد، سوپرپارامغناطیسی است. لازم به ذکر است که در مواد سوپرپارامغناطیس، وقتی شدت میدان اعمالی صفر شود، مغناطیس در ماده صفر می‌شود و Mr وجود نخواهد داشت و منحنی از مرکز عبور خواهد کرد و دو منحنی کاملاً بر روی یکدیگر خواهند افتاد. هم‌چنین، در این حالت مقدار بازدارندگی مغناطیسی (Hc) یا نیروی ضد پسماند نیز صفر خواهد بود. بنابراین، هرچقدر Mr و Hc به صفر نزدیک‌تر شوند، حلقه یا منحنی هیستریزس کوچکتر و به خاصیت سوپرپارامغناطیس نزدیک‌تر می‌شود [۳۸].

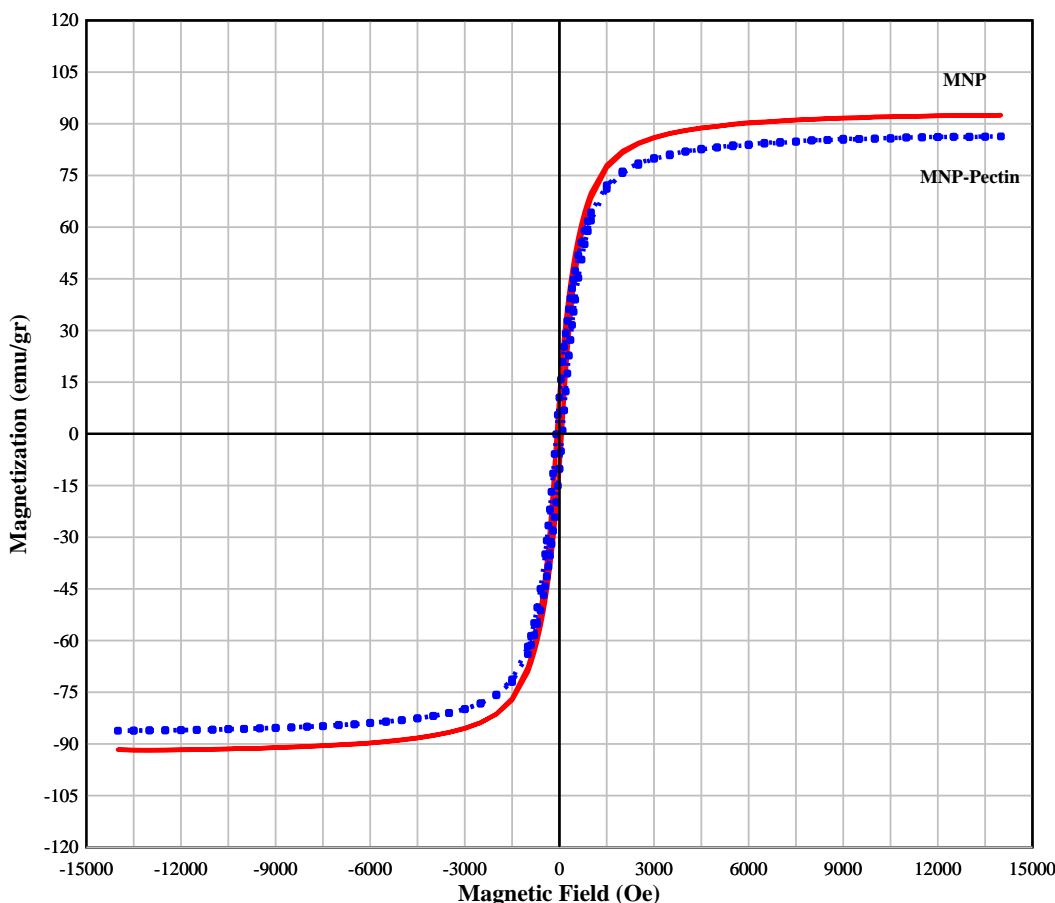
آزمایش‌های مختلفی برای بررسی پوشش‌دهی نانوذرات وجود دارد، ولی چون خاصیت مغناطیسی نانوذرات و تغییرات آن با ایجاد پوشش بر روی سطح آن برای پژوهش ما اهمیت دارد، از آزمایش VSM استفاده شده که در ادامه نتایج آن ذکر شده است. چنان‌که در شکل (۱) و نتایج بیان‌شده در جدول (۲) پیدا است، مقدار مغناطیس اشباع نانوذرات پوشش داده شده با پکتین نسبت به نانوذرات خالص به میزان ۶ emu/gr کاهش یافته و از ۹۲ برای نانوذرات بدون پوشش به ۸۶ emu/gr برای نانوذرات پوشش داده شده، تغییر یافته است. علت این کاهش در مغناطیس اشباع را می‌توان ناشی از وجود لایه غیر مغناطیسی پکتین بر روی سطح نانوذرات بیان کرد و خود این تغییر، نشان‌دهنده انجام واکنش پوشش‌دهی و ایجاد لایه‌ای از پکتین بر روی سطح نانوذرات است. علاوه بر این، همان‌طور که در شکل (۱) دیده می‌شود، منحنی هیستریزس نانوذرات بسیار کوچک است که نشان‌دهنده خاصیت

جدول ۲. نتایج حاصل از آزمایش VSM نانوذرات.

Table 2. The results of the VSM test of nanoparticles.

Nanoparticle type	Saturation magnetization Ms (emu/gr)	Remanence magnetization Mr (emu/gr)	Coercivity Hc (Oe)	Squareness ratio (Mr/Ms)
Pure nanoparticle	92	10.4	78	0.11
Coated nanoparticles	86	10.3	95	0.11

1. Squareness Ratio



شکل ۱. اندازه‌گیری خاصیت مغناطیسی نانوذرات پوشش داده شده با پکتین (MNP-Pectin) و بدون پکتین (MNP) با استفاده از آزمایش VSM.

Figure 1. Measuring the magnetic properties of nanoparticles coated with pectin (MNP-Pect) and without pectin (MNP) using VSM test.

### ۳-۳ بررسی اتصال آنتی‌بادی FITC anti-human CD20

#### بررسی سطح نانوذرات داده شده

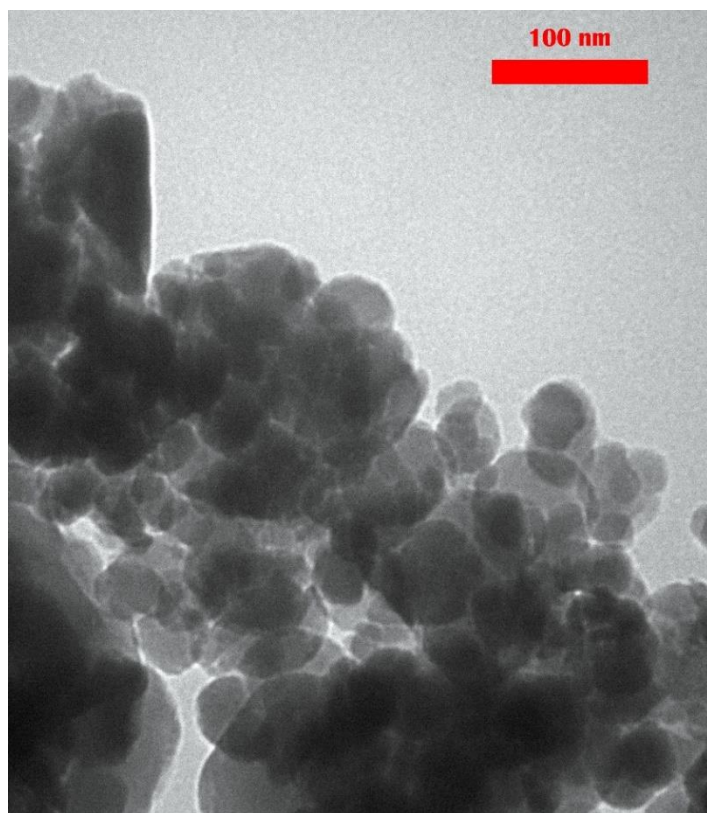
برای اتصال آنتی‌بادی یا ثابت کردن<sup>۱</sup> آن بر روی سطح نانوذرات، روش‌ها و راه‌بردهای مختلفی وجود دارد؛ یکی از راه‌بردها براساس نوع اتصال بین نانوذرات و آنتی‌بادی است، که به دو گروه اصلی، یکی اتصالات فیزیکی و دیگری اتصالات کووالانسی یا شیمیایی تقسیم‌بندی می‌شود. اتصالات فیزیکی از نوع الکترواستاتیک است و اتصالات کووالانسی به سه گروه و براساس گروه عاملی واکنش‌دهنده بر روی آنتی‌بادی تقسیم می‌شود، که عبارت است از:

- ۱- اتصال کووالانسی گروه‌های کربوکسیل (-COOH) در FC آنتی‌بادی با نانوذرات یا ترکیبات حاوی آمین

### ۳-۲ آزمایش TEM نانوذرات پوشش داده شده

برای بررسی اعمال پوشش بر روی سطح نانوذرات از آزمایش TEM استفاده شد. چنان‌که در قسمت مواد بیان شد، نانوذرات خریداری شده و براساس برگ مشخصات آن، دارای شکل کروی، رنگ قهوه‌ای تیره (مایل به سیاه) و قطری بین ۲۰ تا ۳۰ نانومتر است. در تصویر ارائه‌شده در شکل (۲) که نانوذرات پوشش داده شده با پکتین دیده می‌شود، نقاط سیاه‌رنگ یا تیره‌تر نانوذرات است و نواحی روشن‌تر پکتین است که به خوبی سطح نانوذرات مغناطیسی را پوشش داده است. لذا، این پوشش مانع از کلوخگی و چسبندگی ذرات به یکدیگر می‌شود و امکان اتصال شیمیایی آنتی‌بادی را به نانوذرات- به دلیل گروه‌های عاملی مختلفی که دارد- فراهم می‌آورد.

1. Immobilize Antibody



شکل ۲. تصویر TEM نانوذرات مغناطیسی داده شده با پکتین.

Figure 2. TEM image of magnetic nanoparticles coated with pectin.

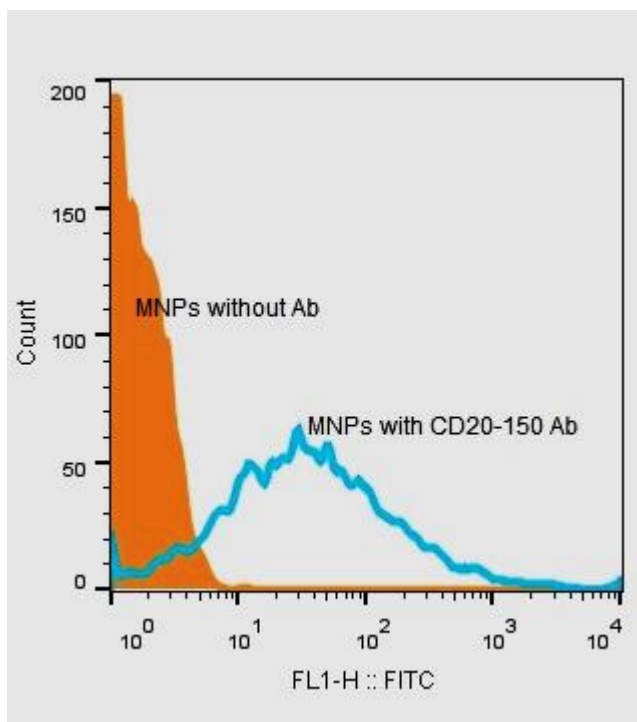
گرفته شد؛ یکی نمونه آزمایش (نانوذرات واکنش داده با آنتی‌بادی) و دیگری نمونه کنترل یا نانوذرات فاقد آنتی‌بادی. تصاویر مربوطه هر دو نمونه در شکل (۳) پیدا است که کردار آبی‌رنگ (نانوذرات حاوی آنتی‌بادی) کاملاً جلوتر و متمایز از کردار پرشده و قهوه‌ای‌رنگ (نمونه کنترل یا نانوذرات فاقد آنتی‌بادی) است و میزان MFI آن نیز به مراتب بالاتر از نانوذرات بدون آنتی‌بادی است. مقدار MFI نانوذرات حاوی آنتی‌بادی برابر با ۵۵ است، در حالی که میزان MFI نانوذرات بدون آنتی‌بادی بسیار پایین و در حدود ۱ تا ۲ است. لازم به ذکر است که مقدار MFI معیاری از مقدار یا میزان آنتی‌بادی به روی سطح نانوذرات است و این ناشی از تغییرات شدت نور فلورسنت (MFI) بین نانوذرات فاقد آنتی‌بادی و حاوی آنتی‌بادی است [۸،۲۶،۳۹]؛ چراکه آنتی‌بادی به دلیل حضور رنگ FITC متصل شده به آن در آزمایش فلوسایتومتری قابل شناسایی است، اما نانوذرات فاقد آنتی‌بادی یا نمونه کنترل قابل شناسایی نیست و بنابراین آزمایش فلوسایتومتری اتصال آنتی‌بادی به نانوذرات را تأیید می‌کند.

۲- اتصال کووالانسی گروه‌های آمین در آنتی‌بادی با نانوذرات حاوی کربوکسیل  
 ۳- اتصال کووالانسی زنجیرهای جانبی کربوهیدرات آنتی‌بادی با نانوذرات حاوی آمین  
 در این پژوهش، از EDC/NHS برای اتصال نانوذرات به آنتی‌بادی استفاده شده است تا به واسطه آن یک اتصال کووالانسی بین گروه اسیدی پکتین و آمین آنتی‌بادی تشکیل شود و تحت شرایط واکنش و اختلاط، آنتی‌بادی جدا نشود و کارایی نانوذرات کاهش نیابد. نکته مهم آن است که چون اسید فعال شده با آمین نوع اول و دوم واکنش می‌دهد و آمین نوع اول در کل ساختار آنتی‌بادی و هم محل اختصاصی اتصال آنتی‌بادی با آنتی‌ژن<sup>۱</sup> قرار دارد، ممکن است موجب کاهش کارایی آنتی‌بادی شود که نتایج، این امکان را مشخص خواهد کرد.

نتایج حاصل از آزمایش فلوسایتومتری اتصال آنتی‌بادی و نانوذرات را به یکدیگر تأیید می‌کند. چنان‌که بیان شد برای بررسی اتصال آنتی‌بادی به نانوذرات، هم‌زمان از دو نمونه، آزمایش فلوسایتومتری

2. Mean Fluorescent Intensity

1. Paratope



شکل ۳. کردار هیستوگرام فلوسایتومتری نانوذرات داده شده با پکتین حاوی آنتی‌بادی و بدون آنتی‌بادی.

Figure 3. Flow cytometry histogram of nanoparticles coated with pectin containing antibody and without antibody.

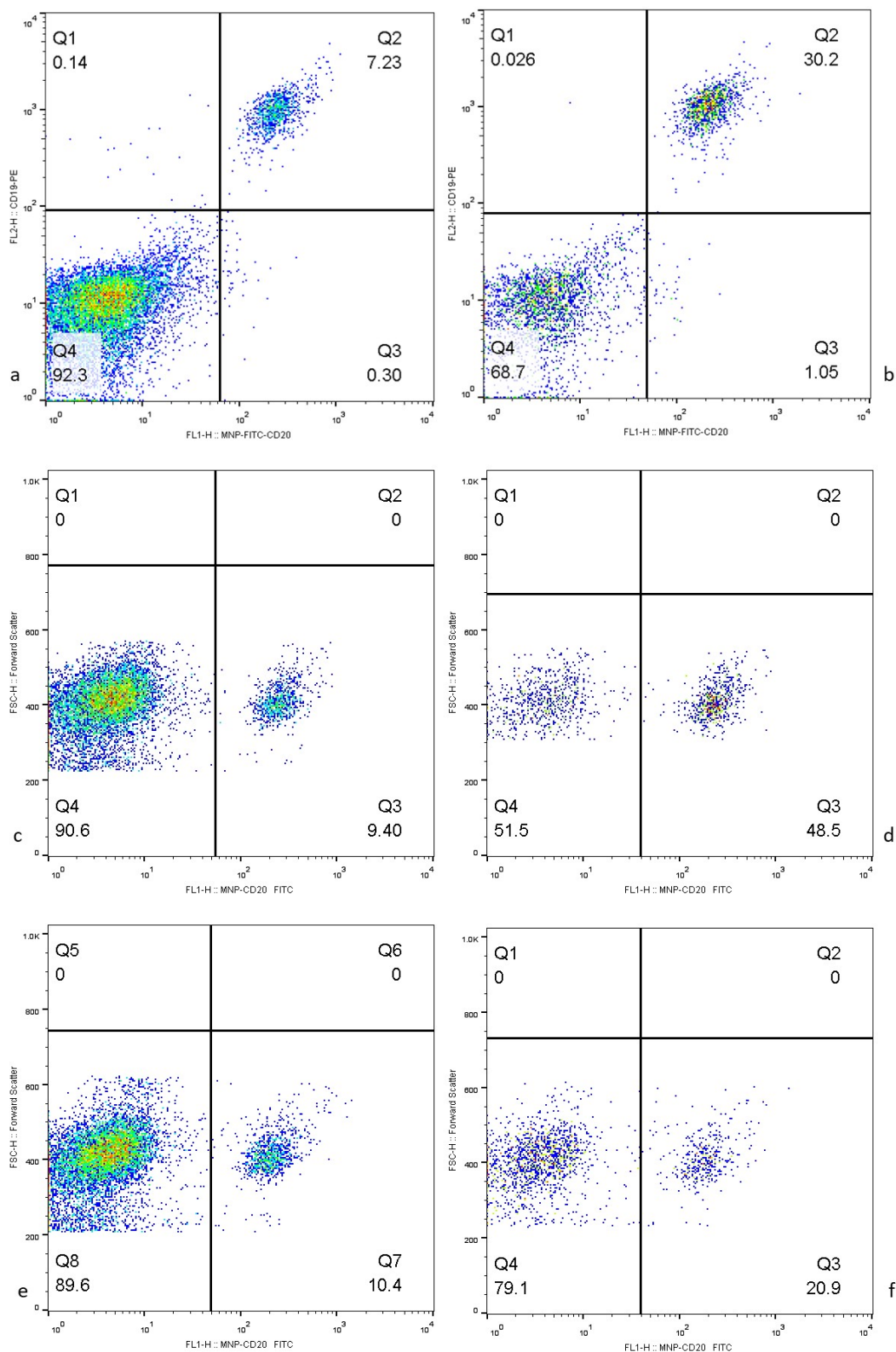
استفاده شد و از آنتی‌بادی دوم یعنی PE anti-human CD19 با رنگ PE در آزمایش فلوسایتومتری و برای تأیید جداسازی سلول‌های هدف از محیط استفاده شد.

برای تعیین عملکرد نانوذرات حاوی آنتی‌بادی، مقدار ۵۰ میکرولیتر از نانوذرات حاوی آنتی‌بادی با سلول‌های لنفوای (PBMCs) مجاور شد و بعد از انجام واکنش و رنگ‌آمیزی، با فلوسایتومتری آنالیز شد. همان‌طور که در شکل (۴-a,b) و جدول (۳) مشاهده می‌شود، میزان جداسازی سلول‌های هدف با استفاده از نانوذرات حاوی آنتی‌بادی از ۵/۰۶ درصد در نمونه کنترل به ۲۰/۶ درصد در نمونه آزمایش افزایش داشته‌است که دارای بازده ۷۵ درصدی است. علاوه بر این، همان‌طور که در گراف‌های آزمایش مشاهده می‌شود با شست‌وشو تعداد ذرات در مقایسه با نمونه کنترل کاهش یافته و این به معنای جدا شدن سلول‌های اضافی از سلول‌های هدف است.

در آزمایش دیگری و با همان شرایط قبلی و همان مقدار نانوذره، فرایند جداسازی بدون رنگ‌آمیزی و بدون استفاده از آنتی‌بادی دوم (PE anti-human CD19) انجام شد. همان‌طور که در شکل (۴-a,b) مشاهده می‌شود، چون رنگ‌آمیزی انجام

### ۴-۳ بررسی جداسازی و اتصال نانوذره حاوی آنتی‌بادی به سلول‌های B

برای بررسی عملکرد نانوذرات حاوی آنتی‌بادی و همچنین توانایی آن در جدا کردن سلول‌های B از آزمایش فلوسایتومتری استفاده شد. در آزمایش فلوسایتومتری، به منظور مقایسه و دستیابی به نتایج بهتر و توانایی در تفسیر بهتر آن، هر نمونه دارای دو گراف است؛ یکی از گراف‌ها مربوط به نمونه کنترل است و جداسازی سلول‌ها با آهن‌ربا یا یک میدان مغناطیسی خارجی برای آن انجام نشده است. گراف دوم نیز مربوط به نمونه آزمایش است که شست‌وشو یا جداسازی با میدان مغناطیسی خارجی برای آن انجام شده است. درحقیقت، نمونه کنترل تعداد سلول‌های هدف را بدون جداسازی نشان می‌دهد و نمونه آزمایش، میزان غنی‌سازی یا جداسازی سلول‌های هدف را از محیط به واسطه نانوذرات حاوی آنتی‌بادی نشان می‌دهد. همچنین، در این مطالعه از دو آنتی‌بادی استفاده شد؛ یکی برای اتصال به نانوذرات و سپس، اتصال به سلول هدف و جداسازی سلول هدف از بقیه سلول‌ها و آنتی‌بادی دوم برای تأیید سلول‌های جدا شده. بنابراین، چون تقریباً همه سلول‌های B مارکر CD20 و CD19 را بیان می‌کنند، از آنتی‌بادی



شکل ۴. کردار هیستوگرام فلوسایتمتری جداکردن سلول‌ها هدف با نانوذرات حاوی آنتی‌بادی (کردار a, c و e نمونه کنترل و نمونه b, d و f نمونه آزمایش است) نمونه a و b رنگ‌آمیزی شده و سپس، با دستگاه فلوسایتمتری خوانش انجام شده است.

Figure 4. Flow cytometry histogram of separating target cells with nanoparticles containing antibodies (charts a, c and e are control samples and samples b, d and f are test samples). Samples a and b are stained and then analyzed with a flow cytometry device.

جدول ۳. نتایج فلوسایتومتری در ۲ مقدار مختلف از نانوذرات حاوی آنتی‌بادی.

Table 3. Flow cytometry results in 2 different amounts of nanoparticles contain antibodies.

Diagram	amount of nanoparticles (microliters)	The percentage of isolated cells		
		before washing (control)	after washing (Test)	yield of isolation
a & b	50	7.23	30.2	76 %
C & d	50	9.4	48.5	80.6 %
E & f	30	10.4	20.9	50 %

تشکیل ندادند که این نکته مهمی در فرایند فلوسایتومتری است؛ چراکه در صورت وجود کلات یا چسبیدن سلول‌ها به یکدیگر امکان آنالیز آن‌ها با فلوسایتومتری وجود ندارد و این نشان‌دهنده هم عملکرد خوب پکتین و هم اتصال مناسب آنتی‌بادی به سطح نانوذرات است.

### ۳-۵ اثر مقدار نانوذره در جداسازی سلول‌های هدف

در پژوهش‌های قبلی مشخص شده که نانوذرات مغناطیسی داده شده با پکتین، خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد و موجب از بین رفتن سلول‌های سرطانی می‌شود. مانند کار وانگ و همکارانش<sup>۱</sup> که با استفاده از نانوذرات مغناطیسی داده شده با پکتین موفق شدند که درصد سلول‌های سرطان روده را در محیط آزمایشگاهی به صفر برسانند. آنان با استفاده از آزمایش MTT و غلظت‌های مختلف از نانوذرات، مقدار مناسب از غلظت نانوذرات را برای از بین بردن سلول‌های سرطانی مختلف روده به دست آوردند. هم‌چنین، مشخص شد که تأثیر نانوذرات بر روی سلول‌های سالم و میزان زنده ماندن آن‌ها در غلظت‌های کم (تقریباً تا ۶۰ μg/ml) ناچیز است و بیش از ۹۵ درصد سلول‌ها زنده باقی می‌مانند؛ اما با افزایش غلظت، درصد سلول‌های زنده کم می‌شود و مثلاً در غلظت ۱۰۰۰ μg/ml، بیش از ۳۰ درصد سلول‌ها از بین می‌رود [۳۶]. بنابراین، نمی‌توان از مقادیر بالای نانوذرات در جداسازی سلول‌های هدف استفاده کرد، اما یکی دیگر از مواردی که در این پژوهش بررسی شد، تأثیر مقدار نانوذرات در جداسازی سلول‌های هدف بود در مقادیر پایین‌تر از مقدار مناسبی که باعث مرگ سلول‌ها نشود. بر همین اساس، در یکی از آزمایش‌های انجام‌شده و به صورت هم‌زمان، دو مقدار متفاوت ۳۰ و ۵۰ میکرولیتر از نانوذرات حاوی آنتی‌بادی با سلول‌ها مجاور شد و بعد از شست‌وشو، با دستگاه فلوسایتومتری آنالیز شد. نتایج ارائه‌شده

نشده است، سلول‌ها دیگر در ناحیه بالا و سمت راست مشاهده نمی‌شوند، بلکه در ناحیه پایین و سمت راست هستند. لازم‌به ذکر است که به دلیل اختلاف اندازه سلول‌ها و نانوذرات، تفکیک موقعیت سلول‌ها و نانوذرات در آزمایش فلوسایتومتری به خوبی امکان‌پذیر و قابل شناسایی از یکدیگر است و از آنتی‌بادی PE anti-human CD19 برای تأیید عملکرد نانوذرات ساخته‌شده در شناسایی سلول‌های هدف استفاده شده است. در همین راستا و با توجه به امکان تفکیک نانوذرات و سلول‌ها از یکدیگر، نتایج ارائه‌شده در جدول (۳) و شکل (۴-d,c) نشان می‌دهد که میزان سلول‌های B شناسایی‌شده در نمونه کنترل برابر با ۹/۴ بوده و در نمونه آزمایش به ۴۸/۵ افزایش یافته است که دارای بازده ۸۱ درصدی است. چنان‌که پیدا است، بازده جداسازی و میزان سلول‌های جداشده در حالت دوم (بدون رنگ‌آمیزی) از حالت اول تا حدودی بیشتر بوده و از ۷۵ درصد به ۸۱ درصد افزایش یافته است. این نشان می‌دهد که در فرایندهای جداسازی و غنی‌سازی، هرچقدر فرایندهای شست‌وشو و رنگ‌آمیزی کمتر باشد، می‌توان به بازده نسبتاً بالاتری دست یافت و تعداد سلول‌های هدف بیشتری جدا کرد. این بازده بهتر، می‌تواند ناشی از زنده ماندن بیشتر سلول‌ها باشد؛ چراکه با رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی دوم ممکن است که تعدادی از سلول‌ها بمیرد و از بین برود.

نکته مهم دیگر این است که اتصال نانوذرات دارای گروه اسیدی به آمین آنتی‌بادی ممکن است موجب کاهش کارایی آنتی‌بادی - به دلیل اتصال از ناحیه Paratope یا محل اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن - شود؛ اما نتایج و بازده خوب جداسازی و عدم تشکیل کلات، نشان داد که میزان اتصال از این ناحیه بسیار کم بوده و بیشتر اتصال آنتی‌بادی به نانوذرات از ناحیه Fab آنتی‌بادی است. هم‌چنین، در مرحله جداسازی، سلول‌ها و نانوذرات به یکدیگر نچسبیدند و کلوخه

1. Wang et al.

نتایج هم‌چنین، نشان داد که با رنگ‌آمیزی سلول‌ها در آزمایش فلوسایتومتری و کاهش مقدار نانوذرات در واکنش با سلول‌ها، بازده واکنش یا میزان جداسازی سلول‌ها کاهش می‌یابد.

### مراجع

- [1] De, M., Ghosh, P. S., & Rotello, V. M. (2008). Applications of Nanoparticles in Biology. *Advanced Materials*, 20(22), 4225-4241. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.200703183>
- [2] Stark, W. J., Stoessel, P. R., Wohlleben, W., & Hafner, A. (2015). Industrial applications of nanoparticles [10.1039/C4CS00362D]. *Chem Soc Rev*, 44(16), 5793-5805. <https://doi.org/10.1039/C4CS00362D>
- [3] Haghighi, A. H., Tohidian, M., Ghaderian, A., & Shakeri, S. E. (2017). Polyelectrolyte Nanocomposite Membranes Using Surface Modified Nanosilica for Fuel Cell Applications. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 56(6), 383-394. <https://doi.org/10.1080/00222348.2017.1316652>
- [4] Sondhi, S., Sharma, R., Kumar, A., Kamwar, K., & Kaur, P. S. (2023). Chapter 8-Biomedical applications of magnetic nanocarriers—a review. In Inamuddin, J. Neves Cruz, & T. Alalhi (Eds.), *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*, 195-212. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95171-5.00002-9>
- [5] Chidhambaram, N., Kay, S. J. J., Priyadarshini, S., Meenakshi, R., Sakthivel, P., Dhanbalan, S., Shanavas, S., Kamaraj, S.-K., & Thirumurugan, A. (2023). Magnetic Nanomaterials as Catalysts for Syngas Production and Conversion. *Catalysts*, 13(2), 440. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/catal13020440>
- [6] Ng, N., Wan Ibrahim, W. A., Sutirman, Z. A., Sanagi, M. M., & Abdul Keyon, A. S. (2023). Magnetic nanomaterials for preconcentration and removal of emerging contaminants in the water environment. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 8(1), 297-315. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s41204-022-00296-4>
- [7] Mousavi S. H., Movahedi B., Zarrabi A. (2016). Study of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Synthesis for Diagnosis-Therapeutic Applications. *Iranian Chemical Engineering Journal*, 15(84), 6-16. [In Persian]
- [8] Haghighi, A. H., Khorasani, M. T., Faghieh, Z., & Farjadian, F. (2020). Effects of different quantities of antibody conjugated with magnetic nanoparticles on cell separation efficiency. *Heliyon*, 6(4). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03677>

در جدول (۳) و شکل (۴) نشان می‌دهد که زمانی که مقدار نانوذره از ۵۰ به ۳۰ میکرولیتر کاهش یافته، میزان جداسازی نیز کاهش یافته‌است و در نمونه‌های آزمایش از ۴۸/۵ به ۲۰/۹ (شکل (۴)-d,f) تغییر یافته و هم‌چنین بازده واکنش نیز از ۸۰/۶ به ۵۰ درصد کم شده است، بنابراین تغییر مقدار نانوذرات در واکنش، می‌تواند بر روی نتایج تأثیر داشته‌باشد؛ در این آزمایش کاهش به مقدار ۳۰ میکرولیتر مطلوب نبوده و تأثیر منفی بر روی نتایج داشته‌است. این درحالی است که به دلیل عدم جداسازی نانوذرات در نمونه‌های کنترل (شکل (۴)-c,e)، تغییری مشاهده نمی‌شود. لازم به ذکر است که اثر مقدار نانوذرات نیز در یکی دیگر از مطالعات بررسی شده است. در این مطالعه از anti-CD20 آنتی‌بادی برای شناسایی سلول‌های لنفاوی بیان‌کننده مارکر CD20 استفاده شده است. آنتی‌بادی anti-CD20 را از راه اتصال آویدین-بایوتین به نانوذرات متصل کرده‌اند، سپس از نانوذرات حاوی آنتی‌بادی برای شناسایی سلول‌های سرطانی حاوی مارکر CD20 استفاده شده است. نتایج با استفاده از آزمایش فلوسایتومتری و میکروسکوپ کانفوکال<sup>۱</sup> نشان داده است که بازده جداسازی سلول‌های لنفاوی (سرطانی) با نانوذرات مغناطیسی حاوی آنتی‌بادی بیش از ۹۵ درصد بوده است. هم‌چنین، با افزایش مقدار نانوذرات حاوی آنتی‌بادی (۱۰، ۳۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، بازده جداسازی سلول‌ها، تا حدودی (از ۹۵ درصد در مقدار ۱۰ به ۹۸ درصد در مقدار ۵۰ با نانوذرات حاوی ۱۵/۸۶ میکروگرم آنتی‌بادی) افزایش داشته‌است [۲۸].

### ۴. نتیجه‌گیری

نتایج آزمایش TEM و VSM نشان داد که پکتین به خوبی، سطح نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> را پوشش داده است و در نتیجه مانع از کلوخه شدن و چسبیدن نانوذرات به یکدیگر می‌شود. به موجب پوشش پکتین بر روی سطح نانوذرات، مغناطیس اشباع ذرات کاهش یافت و از مقدار ۹۲ emu/gr برای نانوذرات خالص به ۸۶ emu/gr برای نانوذرات داده شده با پکتین تغییر کرد. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که اتصال آنتی‌بادی FITC anti-human CD20 به نانوذرات انجام شده و میزان اتصال آن‌ها به نانوذرات براساس MFI برابر با ۵۵ است. بازده و نتایج آزمایش فلوسایتومتری نشان داد که نانوذرات ساخته شده توانایی جداسازی سلول‌های B را از بقیه سلول‌ها دارد.

1. Confocal Microscopy

- [9] Huang, G., Zhang, C., Li, S., Khemtong, C., Yang, S. G., Tian, R., Minna, J. D., Brown, K. C., & Gao, J. (2009). A Novel Strategy for Surface Modification of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Lung Cancer Imaging. *J Mater Chem*, 19, 6367-6372. <https://doi.org/10.1039/b902358e>
- [10] Frey, N. A., Peng, Sh., Cheng, K., & Sun, S. (2009). Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage. *Chem Soc Rev*, 38(9), 2532-2542. <https://doi.org/10.1039/b815548h>
- [11] Boudon, J., Paris, J., Bernhard, Y., Popova, E., Decreau, R. A., & Millot, N. (2013). Magneto-optical nanomaterials: a SPIO-phthalocyanine scaffold built step-by-step towards bimodal imaging. *Chem Commun (Camb)*, 49(67), 7394-7396. <https://doi.org/10.1039/c3cc41898g>
- [12] Shete, P. B., Patil, R. M., Tiwale, B. M., & Pawar, S. H. (2015). Water dispersible oleic acid-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 377, 406-410. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.10.137>
- [13] Ruiz, A., Salas, G., Calero, M., Hernandez, Y., Villanueva, A., Herranz, F., Veintemillas-Verdaguer, S., Martinez, E., Barber, D. F., & Morales, M. P. (2013). Short-chain PEG molecules strongly bound to magnetic nanoparticle for MRI long circulating agents. *Acta Biomater*, 9(5), 6421-6430. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.12.032>
- [14] Sahoo, Y., Goodarzi, A., Swihart, M. T., Ohulchanskyy, T. Y., Kaur, N., Furlani, E. P., & Prasad, P. N. (2005). Aqueous ferrofluid of magnetite nanoparticles: fluorescence labeling and magnetophoretic control. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(9), 3879-3885. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jp045402y>
- [15] Szymczyk, A., Drozd, M., Kamińska, A., Matczuk, M., Trzaskowski, M., Mazurkiewicz, M., Ziółkowski, R., & Malinowska, E. (2022). Comparative Evaluation of Different Surface Coatings of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Based Magnetic Nano Sorbent for Applications in the Nucleic Acids Extraction. *International journal of molecular sciences*, 23, 8860. <https://doi.org/10.3390/ijms23168860>
- [16] Jahazi Sh., Yaghoubi, H., Akbari H. (2020). Preparation and Characterization of Doxorubicin Loaded Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG Nanoparticles on AGS and MCF-7 Cancer Cells. *Journal Of Biotechnology*, 11(1), 167-175. [In persian] <https://doi.org/http://biot.modares.ac.ir/article-22-29304-en.html>
- [17] Haghghi, A. H., Taherinezhad, S., & Babaei, Z. (2022). A review on the properties of the Iron Oxide nanoparticles coated with different materials used in biomedical applications. *Nano World*, 18(66), 54-71. [In Persian] [https://donyayenano.ir/article\\_252675\\_8b4fae5b540f0f136cbee5717f75950.pdf](https://donyayenano.ir/article_252675_8b4fae5b540f0f136cbee5717f75950.pdf)
- [18] Liu, S., Yu, B., Wang, S., Shen, Y., & Cong, H. (2020). Preparation, surface functionalization and application of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 281, 102165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102165>
- [19] Rostami Elham, Howezi E. (2023). Preparation and Biological Investigation of Iron Magnetic Nanoparticles Coated with Chitosan/Alginate Biopolymer (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Alg/CS). *Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 31(2), 31-41. [In Persian]
- [20] Li, D. Q., Li, J., Dong, H. L., Li, X., Zhang, J. Q., Ramaswamy, S., & Xu, F. (2021). Pectin in biomedical and drug delivery applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 185, 49-65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.088>
- [21] Laghmouchi, A., Hoogstraten, C., Falkenburg, J. H. F., & Jedema, I. (2020). Long-term in vitro persistence of magnetic properties after magnetic bead-based cell separation of T cells. *Scand J Immunol*, 92(3), e12924. <https://doi.org/10.1111/sji.12924>
- [22] Hong, W., Lee, S., Chang, H. J., Lee, E. S., & Cho, Y. (2016). Multifunctional magnetic nanowires: A novel breakthrough for ultrasensitive detection and isolation of rare cancer cells from non-metastatic early breast cancer patients using small volumes of blood. *Biomaterials*, 106, 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.08.020>
- [23] Sande, M. G., Roque, L., Braga, A., Marques, M., Ferreira, D., Saragliadis, A., Rodrigues, J. L., Linke, D., Ramada, D., Silva, C., & Rodrigues, L. R. (2023). Design of new hydrolyzed collagen-modified magnetic nanoparticles to capture pathogens. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 111(2), 354-365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.b.35155>
- [24] Takahashi, M., Yoshino, T., Takeyama, H., & Matsunaga, T. (2009). Direct magnetic separation of immune cells from whole blood using bacterial magnetic particles displaying protein G. *Biotechnology Progress*, 25(1), 219-226. [<https://doi.org/10.1002/btpr.101>].
- [25] Xu, H., Aguilar, Z. P., Yang, L., Kuang, M., Duan, H., Xiong, Y., Wei, H., & Wang, A. (2011). Antibody conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for cancer cell separation in fresh whole blood. *Biomaterials*, 32(36), 9758-9765. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.076>

- [26] Haghghi, A. H., Faghhi, Z., Khorasani, M. T., & Farjadian, F. (2019). Antibody conjugated onto surface modified magnetic nanoparticles for separation of HER2+ breast cancer cells. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 490, 165479. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2019.165479>
- [27] Robinson, H. R., Qi, J., Cook, E. M., Nichols, C., Dadashian, E. L., Underbayev, C., Herman, S. E. M., Saba, N. S., Keyvanfar, K., Sun, C., Ahn, I. E., Baskar, S., Rader, C., & Wiestner, A. (2018). A CD19/CD3 bispecific antibody for effective immunotherapy of chronic lymphocytic leukemia in the ibrutinib era. *Blood*, 132(5), 521-532. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-830992>
- [28] Sahoo, S. L., Liu, C. H., & Wu, W. C. (2017). Lymphoma cell isolation using multifunctional magnetic nanoparticles: antibody conjugation and characterization [10.1039/C7RA02084H]. *RSC Advances*, 7(36), 22468-22478. <https://doi.org/10.1039/C7RA02084H>
- [29] Wang, K., Wei, G., & Liu, D. (2012). CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol*, 1(1), 36. <https://doi.org/10.1186/2162-3619-1-36>
- [30] Tedder, T. F. (2009). CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 5(10), 572-577. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.184>
- [31] Khashei Siuki, H., Ghamari Kargar, P., & Bagherzade, G. (2022). New Acetamidine Cu(II) Schiff base complex supported on magnetic nanoparticles pectin for the synthesis of triazoles using click chemistry. *Scientific reports*, 12(1), 3771. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07674-7>
- [32] Namanga, J., Foba, J., Ndinteh, D. T., Yufanyi, D. M., & Krause, R. W. M. (2013). Synthesis and Magnetic Properties of a Superparamagnetic Nanocomposite "Pectin-Magnetite Nanocomposite". *Journal of Nanomaterials*, 2013, 137275. <https://doi.org/10.1155/2013/137275>
- [33] Attallah, O. A., Al-Ghobashy, M. A., Nebsen, M., El-Kholy, R., & Salem, M. Y. (2018). Assessment of pectin-coated magnetite nanoparticles in low-energy water desalination applications. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(19), 18476-18483. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2060-9>
- [34] Beigi, P., & Babamoradi, M. (2023). Preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@pectin nanocomposite hydrogel with high heating efficiency for hyperthermia applications. *Physica B: Condensed Matter*, 670, 415360. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.physb.2023.415360>
- [35] Ferreira, L. P., Reis, C. P., Robalo, T. T., Melo Jorge, M. E., Ferreira, P., Gonçalves, J., Hajalilou, A., & Cruz, M. M. (2022). Assisted Synthesis of Coated Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia. *Nanomaterials*, 12(11), 1870. <https://www.mdpi.com/2079-4991/12/11/1870>
- [36] Wang, C., Li, G., Karmakar, B., AlSalem, H. S., Shati, A. A., El-kott, A. F., Elsaid, F. G., Bani-Fwaz, M. Z., Alsayegh, A. A., Salem Alkhayyat, S., & El-Saber Batiha, G. (2022). Pectin mediated green synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Pectin nanoparticles under ultrasound condition as an anti-human colorectal carcinoma bionanocomposite. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(6), 103867. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103867>
- [37] Zhang, Q., Cui, W., Guo, H., Wang, B., Wang, H., Zhang, J., & Li, W. (2022). One-pot preparation of nano-scaled magnetic-pectin particles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@pectin NPs): cytotoxicity, antioxidant, and anti-liver cancer properties. *Journal of Experimental Nanoscience*, 17(1), 326-338. <https://doi.org/10.1080/17458080.2022.2063279>
- [38] Rukhsar, M., Ahmad, Z., Rauf, A., Zeb, H., Ur-Rehman, M., & Hemeg, H. A. (2022). An Overview of Iron Oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Nanoparticles: From Synthetic Strategies, Characterization to Antibacterial and Anticancer Applications. *Crystals*, 12(12), 1809. <https://www.mdpi.com/2073-4352/12/12/1809>
- [39] Weiqi, W., Wang, L., Li, Z., & Xie, Z. (2016). BODIPY-containing nanoscale metal organic framework for photodynamic therapy. *Chem. Commun.*, 52. <https://doi.org/10.1039/C6CC01048B>