



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ميسان
كلية العلوم
قسم الكيمياء



تحضير مستشعر نانوي من Copper Nanoparticles CuNPs لتقدير الألبومين في عينات الأدرار للمرضى المصابين بأمراض الكلى

بحث مقدم
الى مجلس قسم الكيمياء / كلية العلوم / جامعة ميسان
وهو جزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس في علوم الكيمياء

اعداد الطالبتان
زهراء قاسم حسن
ابرار سعد عبد الزهرة

أشرف
أ.م.د. زيدون طارق العقابي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ ﴾

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ

سورة المجادلة : آية ١١

الإهداء

"إلى من أنار بعلمه العقول، و وهب السائلين الإجابة، وكشف بنوره حيرة العلماء، إلى رب العالمين، صاحب الفضل والمنّة في كل نجاح، إليك أرفع شكري وحمدي..
الشكر موصول للإمام جعفر الصادق عليه السلام، أب الكيمياء، الذي أسهمت إسهاماته العلمية في تأسيس هذا العلم ورسمت طريقه نحو التطور..
إلى والديّ العزيزين، منكم تعلمت معنى الإصرار والكفاح، وبفضل دعائكما وصل شفغفي إلى مداه؛ أنتما الجسر الذي عبرت عليه إلى تحقيق الحلم، وكل لحظة تعب سهرتما فيها من أجلي تستحق هذا الإهداء..

إلى أستاذي الفاضل مشرفي القدير دكتور زيدون طارق المحترم ، منبع الحكمة ونور التوجيه..

إلى أصدقائي واخوتي واخواتي ، منكم استمددت الأمل..

وأخيرًا، إلى كل من آمن بأن لكل تعبٍ ثمرة، ولكل سعيٍ هدف، أهدى هذا العمل لكل قلب آمن بأن المستحيل مجرد كلمة، ولكل روح لا تعرف الاستسلام"
"لكم أنتم جميعًا أهدى هذا النجاح، والذي ما كان ليحقق دونكم."

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيدنا محمد واله الطيبين..

بدايةً، أتوجه بجزيل الشكر والتقدير إلى الله سبحانه وتعالى على نعمه التي لا تُعد ولا تُحصى، والتي مكنتنا من إتمام هذا البحث بكل جدٍ واجتهاد..

كما أتوجه بخالص الشكر والعرفان إلى مشرفي العزيز [دكتور زيدون]، الذي لم يبخل علينا بتوجيهاته السديدة ونصائحه القيمة، التي كانت لها بالغ الأثر في نجاح هذا العمل شكراً لجهوده المبذولة منذ اقتراحه موضوع البحث كانت إرشاداته الدقيقة بمثابة الدافع الأكبر لنا في تقديم هذا البحث بالشكل الأمثل نتمنى لك التوفيق والنجاح في مساعيك وجزاك الله عنا كل خير..

شكراً إلى كل أعضاء الهيئة التدريسية وإلى السيد رئيس القسم المحترم، كما ونتوجه بخالص الشكر إلى العميد (دكتور تحسين)..

نود أن نشكر أيضاً اصدقائنا الأعزاء على دعمهم وتشجيعهم المستمر، لا يسعنا إلا أن نعبر عن امتنان عميق لكل من ساهم في تقديم المساعدة، سواءً في الجوانب العلمية أو العملية..

وأخيراً، لا يمكنني أن أنسى أسرتي الكريمة التي وقفت بجانبتي منذ البداية وحتى النهاية، سواء بدعمهم المعنوي أو تحفيزهم المستمر، ليكون هذا الإنجاز ثمرة تعبنا المشترك.

شكراً لكم جميعاً، فبدونكم ما كان لهذا البحث أن يرى النور.

الفهرس

| الموضوع | رقم الصفحة |
|---------------------------------------|------------|
| المخلص | ٦ |
| المقدمة | ١٦-٧ |
| Nanotechnology | ٧ |
| Nano sensors | ٨ |
| Detection of albumin | ٩ |
| الطرق التحليلية المستخدمة | ١١ |
| Microfluidics in detection of albumin | ١٣ |
| التقدير الكمي واللوني للألبومين | ١٥ |
| هدف البحث | ١٦ |
| المواد وطرق العمل | ١٨-١٧ |
| الادوات والمواد لمستخدمه | ١٧ |
| طريقة العمل | ١٨ |
| النتائج | ٢٢-٢٠ |
| الحسابات | ٢٣ |
| المناقشة | ٢٥ |
| الاستنتاجات | ٢٧ |
| المصادر | ٢٨ |

الملخص:

CuNPS هي جسيمات نانوية من النحاس بإبعاد تتراوح بين 1 و 100 نانومتر تتميز بخصائص فريدة مثل مساحة السطح الكبيرة والتوصيلية الكهربائية والحرارية العالية مما يجعلها مفيدة في تطبيقات متنوعة كعوامل محفزة والمضادات الحيوية وأجهزة استشعار ويمكن تصنيفها بطرق كيميائية وفيزيائية وبيولوجية.

في هذا البحث تم تحضير مستشعر نانوي باستخدام جسيمات النحاس النانوية (CuNPs) لتقدير تركيز بروتين الألبومين في عينات البول لمرضى الكلى، وذلك لأغراض التشخيص المبكر، تم استخدام طريقة التخليق الأخضر الصديقة للبيئة، حيث استُخدم مستخلص اللبان *Boswellia sacra* كمادة مختزلة ومثبتة لتكوين الجسيمات النانوية، لما يحتويه من مركبات فعالة مثل الأحماض البوزويلية والسكريات الأحادية.

في الجزء العملي، تم تحضير محلول كبريتات النحاس ومزجه مع هيدروكسيد الصوديوم ومحلول اللبان، ثم أُضيف محلول هيدرازين هيدريت كمادة مختزلة، لوحظ تغير في اللون إلى الأحمر الداكن مما دلّ على تكوين CuNPs. بعدها، تم تحضير محاليل قياسية من الألبومين (BSA) بتركيزات مختلفة وقياس امتصاصها باستخدام جهاز UV-Vis عند الطول الموجي 589 نانومتر.

أجريت تجربة على عينات بول حقيقية، حيث تم خلطها مع المستشعر النانوي وملاحظة تغيرات الامتصاصية، أظهرت النتائج استجابة طيفية واضحة لانخفاض الامتصاصية، مما يشير إلى تفاعل الألبومين مع CuNPs وأكدت فعالية المستشعر في الكشف عن الألبومين حتى بتركيزات منخفضة.

تدل هذه النتائج على أن استخدام جسيمات النحاس النانوية يوفر طريقة تحليلية بسيطة، سريعة، وفعالة للكشف عن مؤشرات أمراض الكلى، مما يساهم في تحسين فرص التشخيص المبكر وتطوير أدوات نانوية مستقبلية للتطبيقات الطبية.

المقدمة introduction

: Nanotechnology

النانو تكنولوجيا هي مجال علمي وتقني يتعامل مع المواد والهياكل عند مقياس النانومتر (1-100 نانومتر) وهو مقياس صغير جدًا حيث تبدأ الخصائص الفيزيائية والكيميائية للمادة في التغير بطرق غير تقليدية في هذا المقياس، تُظهر المواد خصائص جديدة وغير متوقعة، مثل زيادة التوصيلية الكهربائية أو تحسين الخصائص الميكانيكية، نتيجة للتأثيرات الكمية السائدة في هذا النطاق. [1,2]

يُعد هذا المجال ثورة في العلم والهندسة، حيث يُمكن الباحثين من تصميم مواد وأجهزة دقيقة تُستخدم في مجموعة واسعة من التطبيقات بما في ذلك الطب، الإلكترونيات، والطاقة. على سبيل المثال، يمكن تصنيع المواد النانوية مثل النقاط الكمومية (Quantum Dots) الأنابيب النانوية الكربونية (Carbon nanotubes) لاستخدامها في التصوير الطبي أو نقل الأدوية إلى خلايا محددة. [2]

في الطب الحيوي، لعبت النانو تكنولوجيا دورًا كبيرًا في تطوير المستشعرات النانوية (Nano sensors) والتي يمكنها الكشف عن الجزيئات الحيوية أو البروتينات بدقة عالية حتى في تركيبات صغيرة جدًا. [3]

أهمية النانو تكنولوجيا في الطب الحيوي:

تُمثل النانو تكنولوجيا أداة قوية للتشخيص والعلاج الطبي. تمكن الباحثون من تطوير أجهزة وأدوات دقيقة جدًا قادرة على الوصول إلى الجزيئات الحيوية داخل الجسم والعمل على مستويات دقيقة جدًا لم يكن بالإمكان الوصول إليها في الماضي. من خلال استخدام جزيئات نانوية بحجم البروتينات، يمكن الكشف عن الأمراض في مراحلها المبكرة مما يزيد من فعالية العلاجات. [3]

مثال على ذلك هو المستشعرات النانوية القادرة على قياس تركيز الألبومين في عينات البول.

التطبيقات المستقبلية للنانو تكنولوجيا:

في المستقبل، من المتوقع أن تستمر النانو تكنولوجيا في رفع مستوى حدود الطب التشخيصي والعلاجي حيث يجري العمل على تطوير الأدوية النانوية (Nano medicine) التي يمكنها استهداف خلايا معينة داخل الجسم، مما يقلل من الآثار الجانبية للعلاج الكيميائي على سبيل المثال. كما أن النظم الميكروسيالية والنانوية المدمجة مع الذكاء الاصطناعي تُعد من بين الأدوات التي قد تساعد في توفير رعاية صحية شخصية Personalized Healthcare قادرة على التنبؤ بأمراض معينة وعلاجها بشكل استباقي. [4]

المستشعرات النانوية (Nano sensors) :

تُعد المستشعرات النانوية من أبرز التطبيقات التكنولوجية التي برزت في العقدين الأخيرين بفضل التطورات الهائلة في مجال النانو تكنولوجيا، تُستخدم المستشعرات النانوية للكشف عن التغيرات الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية بدقة عالية [3] ، ويعتمد عملها على خصائص المواد النانوية التي تتميز بقدرتها على التفاعل مع الجزيئات الحيوية والبيئية بشكل حساس جدًا حتى في التركيزات المنخفضة.

تُعتبر المستشعرات النانوية تقدمًا ثوريًا في مجال التشخيص الطبي والبيئي، مع تطور تكنولوجيا النانو، من المتوقع أن تصبح هذه المستشعرات أدوات أساسية في مراقبة وعلاج العديد من الأمراض، خاصةً في المجالات التي تتطلب دقة وسرعة في الكشف مثل أمراض الكلى.

ما هي المستشعرات النانوية؟

المستشعرات النانوية هي أجهزة صغيرة جدًا تُستخدم لاكتشاف وتحليل الجزيئات والمواد المختلفة، تعتمد هذه المستشعرات على مواد نانوية، مثل النقاط النانوية (Quantum Dots) و الأنابيب النانوية الكربونية (Carbon Nanotubes) أو الجسيمات النانوية المعدنية (Metallic Nanoparticles) مثل جسيمات النحاس النانوية – Copper Nanoparticles (CuNPs) تتميز هذه المواد بخصائص فريدة، مثل التوصيل الكهربائي الفائق أو المساحة السطحية الكبيرة، مما يجعلها أكثر حساسية تجاه الجزيئات المستهدفة. [4]

آلية عمل المستشعرات النانوية:

تعمل المستشعرات النانوية عن طريق التفاعل المباشر بين المادة النانوية والجزيء المستهدف. يمكن أن تعتمد هذه التفاعلات على عدة آليات، مثل التغيرات الكهربائية أو الضوئية أو الميكانيكية، مما يؤدي إلى إنتاج إشارة قابلة للقياس . وفيما يلي شرح لأنواع المستشعرات النانوية

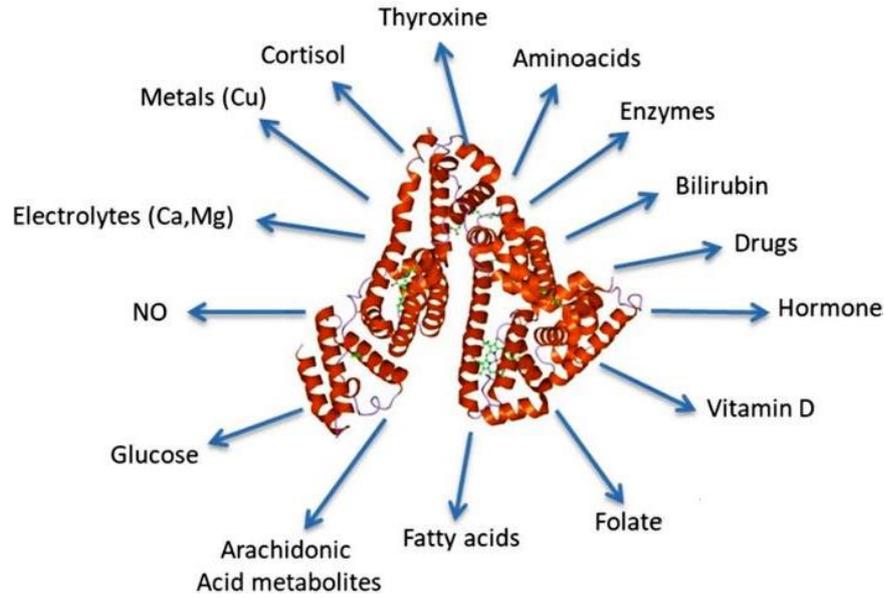
١. المستشعرات النانوية الكهروكيميائية (Electrochemical Nano sensors): تستخدم هذه المستشعرات لتقدير المركبات الحيوية والكيميائية عن طريق قياس التغيرات في الإشارات الكهروكيميائية، حيث تعتمد على قياس التغيرات في الخصائص الكهربائية (مثل التيار، الجهد، المقاومة، السعة) الناتجة عن تفاعلات كيميائية تحدث على سطح المستشعر أو بالقرب منه. [5]

٢. المستشعرات النانوية الضوئية (Optical Nano sensors): تعتمد هذه المستشعرات على تغيرات في الخواص الضوئية عند تفاعل المادة النانوية مع الجزيئات المستهدفة، وتعتمد المستشعرات الضوئية على قياس التغيرات في خصائص الضوء (مثل الامتصاص، الانبعاث، التشتت، الانكسار) الناتجة عن تفاعل المادة الهدف مع عنصر الاستشعار تستخدم هذه المستشعرات عادةً في تطبيقات التصوير الطبي أو اكتشاف الجزيئات الحيوية . [3,6]

٣. المستشعرات النانوية الميكانيكية (Mechanical Nano sensors): تعمل على قياس التغيرات في الخواص الميكانيكية مثل الترددات أو الاهتزازات عند تفاعل المادة المستشعرة مع الهدف، تُستخدم هذه المستشعرات عادةً في قياس القوة أو الإجهاد في الأنظمة الميكروية. [6]

الكشف عن الألبومين (Detection of albumin) :

الألبومين هو بروتين رئيسي يتم تصنيعه في الكبد بواسطة خلايا الكبد بمعدل 10-150 غرام ويمثل حوالي 60% من البروتينات البلازمية. دوره الأساسي يشمل الحفاظ على التوازن الأسموزي في الدم ونقل العديد من الجزيئات مثل الأحماض الدهنية، الفيتامينات، والمعادن. الألبومين مشحون بشحنة سالبة عند درجة الحموضة الفسيولوجية 7.4 بسبب وجود العديد من بقايا الأحماض الأمينية الحمضية، هذه الشحنة السالبة ضرورية لقدرته على الارتباط بالأيونات الموجبة الشحنة مثل الكالسيوم، تغييرات مستوى الألبومين في الجسم خاصة في البول، قد تكون مؤشراً على وجود أمراض مثل أمراض الكلى أو أمراض الكبد. [7,8]



المخطط يوضح المواد الرئيسية التي ينقلها الألبومين.

: Clinical Significance of Albumin Levels In Urine

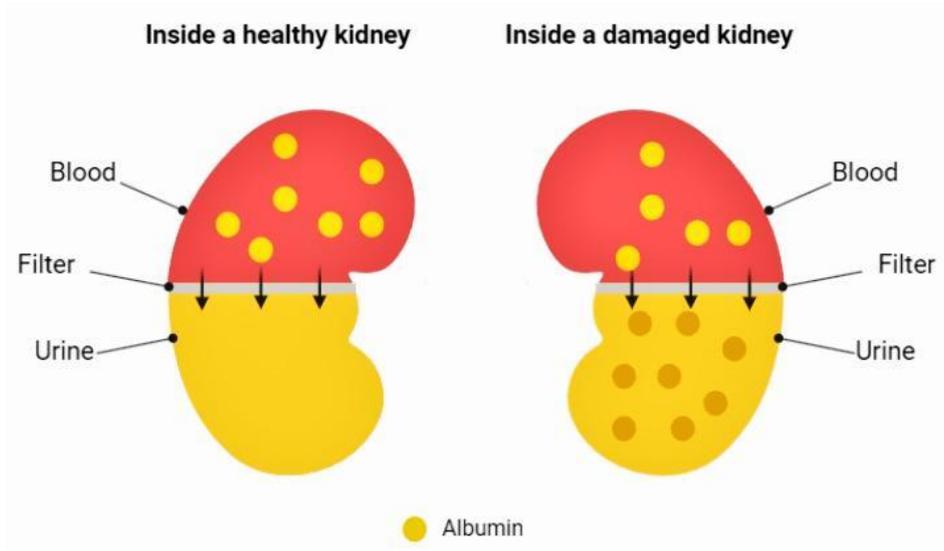
تُعد القيمة الطبيعية لتركيز الألبومين في البول لدى الأفراد الأصحاء أقل من 30 $\mu\text{g/mL}$ وتشير الدراسات إلى أن المستويات التي تتراوح بين 30 – 300 $\mu\text{g/mL}$ تعرف بـ الميكروألبومينوريا (Microalbuminuria) التي تُعدّ من المؤشرات المبكرة لوجود مشاكل كلوية، أما المستويات التي تتجاوز 300 $\mu\text{g/mL}$ فتُعرف بـ الماكروألبومينوريا (Macroalbuminuria) وهي مؤشر على مرحلة متقدمة من الضرر أو التلف الكلوي. [14]

أهمية الكشف عن الألبومين:

الأمراض الكلوية: وجود كميات غير طبيعية من الألبومين في البول (البيلة ألبومينية) قد يشير إلى تلف في الكلى، الألبومين لا يعبر عادةً الكلية إلى البول إلا في حالات التلف في المرشحات الكلوية (الكبيبات).

أمراض الكبد: انخفاض مستويات الألبومين في الدم قد يكون مؤشرًا على تراجع وظيفة الكبد في تصنيع البروتينات.

الحالات المزمنة: مثل داء السكري وارتفاع ضغط الدم، حيث يُستخدم قياس الألبومين لمراقبة تأثير تلك الحالات على وظائف الكلى. [7,8]



Albumin in urine

نموذج يوضح بيلة الألبومينية في كلى مصابة مقارنة بكلى سليمة

الطرق التحليلية المستخدمة لتقدير الألبومين:

تتنوع طرق الكشف عن الألبومين بين التقليدية والتقنيات الحديثة، تعتمد الطرق التقليدية على التفاعلات الكيميائية والطيفية، وهي دقيقة وموثوقة. أما الطرق الحديثة التي تعتمد على الجسيمات النانوية والتكنولوجيا الدقيقة، فهي تُقدم حساسية أعلى وسرعة أكبر، مما يُعزز من القدرة على تشخيص ومراقبة الحالات المرضية بشكل أسرع وأدق.

هناك عدة طرق تحليلية معروفة عالمياً تُستخدم لتقدير الألبومين، وكل منها يعتمد على آلية معينة لقياس تركيز هذا البروتين في العينات. فيما يلي شرح مُفصل ألهم هذه الطرق:

١. التحليل الطيفي الضوئي (Spectrophotometry):

التحليل الطيفي الضوئي هو أحد أشهر الطرق المستخدمة لتقدير الألبومين. تعتمد هذه الطريقة على تفاعل كيميائي بين الألبومين وكاشف معين ينتج مركباً ملوناً. يتم قياس شدة اللون الناتج باستخدام جهاز الطيف الضوئي عند طول موجي معين. [12]

آلية العمل:

يتم إضافة كاشف خاص، مثل صبغة البروموكريسول الأخضر BCG (BromocresolGreen) إلى العينة التي تحتوي على الألبومين، يتفاعل الألبومين مع الصبغة لتكوين مركب ملون يتناسب مع تركيز الألبومين في العينة، يتم قياس امتصاص الضوء بواسطة جهاز الطيف الضوئي عند طول موجي محدد عادة (630 نانومتر)، ويتم مقارنة الامتصاص بمعايير معروفة لتحديد تركيز الألبومين.

مزايا الطريقة:

- سريعة وسهلة الاستخدام.
- حساسة للتغيرات الصغيرة في تركيز الألبومين.

2. التحليل المناعي (Immunoassay):

تعتمد تقنيات التحليل المناعي على التفاعل النوعي بين الألبومين والأجسام المضادة المخصصة له. تُستخدم هذه الطريقة بشكل واسع نظراً لدقتها وحساسيتها العالية، خاصة في تقدير تراكيزات منخفضة من الألبومين، مثل الميكروألبومين في البول. [8]

أنواع التحليل المناعي:

- التحليل المناعي الإشعاعي (Radioimmunoassay – RIA) يعتمد على استخدام مواد مشعة مرتبطة بالألبومين أو الأجسام المضادة، ويتم قياس النشاط الإشعاعي لتحديد كمية الألبومين.
- التحلل المناعي الأنزيمي (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA)

يستخدم الأجسام المضادة المرتبطة بإنزيم معين، وعند تفاعل الإنزيم مع الركيزة ينتج لون يمكن قياسه طيفياً
مزايا الطريقة:

- دقيقة وحساسة جداً، مما يجعلها مناسبة لقياس تراكيز منخفضة من الألبومين.
- يمكن استخدامها في العينات البيولوجية المختلفة (الدم، البول، إلخ..).

3. التحلل الكهروكيميائي (Electrochemical Analysis):

تُستخدم تقنيات التحليل الكهروكيميائية، مثل الفولتمترية (Voltammetry) المبيرومترية (Amperometry) تقدير الألبومين بناءً على تفاعلات كهروكيميائية تحدث على سطح المستشعرات، تُستخدم هذه التقنية بشكل خاص في المستشعرات النانوية (Nano sensors) التي تعتمد على جزيئات نانوية، مثل جسيمات النحاس النانوية CuNPS التي تتفاعل مع الألبومين وتغير التيار الكهربائي المار عبر المستشعر. [6]

آلية العمل:

يتم وضع العينة على مستشعر نانوي يتكون من مواد نانوية مثل CuNPS يتفاعل الألبومين مع سطح المستشعر، مما يؤدي إلى تغيرات في الإشارات الكهربائية، مثل التيار أو الجهد، يتم تحليل هذه الإشارات لتحديد تركيز الألبومين في العينة.
مزايا الطريقة:

- سريعة وحساسة، ومناسبة للكشف المبكر عن الأمراض
- يمكن دمجها في أنظمة تشخيصية صغيرة مثل Lab-on-a-chip.

4. التحليل اللوني الكمي (Colorimetric Quantification):

تُعد هذه الطريقة تقليدية لكنها فعالة، حيث يتم تقدير الألبومين بناءً على تغير اللون في تفاعل معين. تتشابه مع التحليل الطيفي، لكنها تُستخدم غالباً مع أجهزة بسيطة لقياس اللون [13]

آلية العمل:

يتم تفاعل الألبومين مع كاشف يُحدث تغيراً لونياً. يتم قياس اللون الناتج باستخدام جهاز تحليل لوني، والذي يقارن شدة اللون بمعايير معروفة لتحديد تركيز الألبومين.

مزايا الطريقة:

- غير مكلفة وسهلة الاستخدام.
- ملائمة للمختبرات ذات الموارد المحدودة.

❖ كل من هذه الطرق التحليلية له مزاياه واستخداماته الخاصة يعتبر اختيار الطريقة الأنسب لتقدير الألبومين مرتبطاً بعدة عوامل مثل حساسية الطريقة، تكلفتها، وسهولة الاستخدام. وبفضل التطورات في مجال النانو تكنولوجيا والتحليل الكهروكيميائي،

أصبح بالإمكان استخدام مستشعرات نانوية متقدمة لتقدير الألبومين بدقة وسرعة، مما يوفر أداة قوية للتشخيص المبكر للأمراض الكلوية والأمراض المزمنة الأخرى.

Microfluidics in the detection of albumin

الموائع الدقيقة (Microfluidics) في الكشف عن الألبومين ، تُعد تقنية الموائع الدقيقة (Microfluidics) من أبرز الابتكارات الحديثة في مجال التحليل الكيميائي والبيولوجي، حيث تجمع بين الدقة العالية والكفاءة في استهلاك العينات والمواد الكيميائية، مما يجعلها أداة مهمة في الطب الحيوي. تعتبر الموائع الدقيقة منصة مناسبة للكشف عن الألبومين في العينات البيولوجية، خاصة في البول والدم، وهي تقنية يُعتمد عليها للكشف المبكر عن أمراض الكلى، بما في ذلك اعتلال الكلية السكري وأمراض الكلى المزمنة الأخرى. [10]

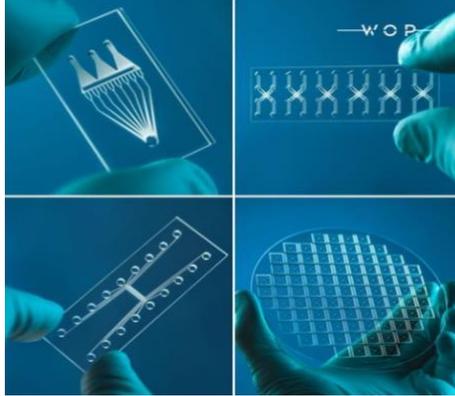
الموائع الدقيقة تعتمد على التحكم الدقيق في السوائل داخل قنوات ميكرومترية الحجم ، هذه القنوات صممت لتوجيه وخط وفصل ومعالجة السوائل بمقياس صغير جداً (عادة في مستوى الميكرو لتر أو النانو لتر). [11]

تُصنع رقائق الموائع الدقيقة من مواد مثل السيليكون، الزجاج، أو البولييمرات مثل PDMS (polydimethylsiloxane)، وتتميز بتصميمها المدمج وقدرتها على استيعاب عمليات معقدة في مساحة صغيرة جداً. هذا يمكن أن يشمل عدة مراحل من التحليل مثل التحضير المسبق للعينة، الكشف، والتصوير، مما يقلل من الوقت المطلوب للتشخيص بشكل كبير. [10]

آلية الكشف عن الألبومين باستخدام الموائع الدقيقة:

1. التشخيص الكهروكيميائي: في هذه التقنية، يتم دمج الأقطاب الكهروكيميائية الدقيقة في النظام الميكروسيالي، حيث يعتمد الكشف عن الألبومين على التفاعلات الكهروكيميائية التي تحدث بين الألبومين والمكونات المحسوسة. عندما يتفاعل الألبومين مع القطب، يحدث تغيير في التيار الكهربائي، والذي يمكن قياسه وتحليله لتحديد كمية الألبومين في العينة. تتميز هذه الطريقة بالدقة العالية والحساسية الاكتشاف حتى التركيزات المنخفضة من الألبومين، مما يجعلها فعالة للكشف المبكر عن بيلة الألبومين الميكروية (Micro albuminuria)، وهي مؤشر مهم على بداية تدهور وظائف الكلى. [10]
2. التحليل اللوني (Colorimetric Detection): تقنية التحليل اللوني تعتمد على التفاعل الكيميائي بين الألبومين وكاشف معين ينتج عنه تغير في اللون. يتم استخدام الموائع الدقيقة لخلط العينات مع الكاشف في قنوات صغيرة، ويمكن بعد ذلك قياس التغير في اللون باستخدام أنظمة بصرية مدمجة في رقاقة الموائع الدقيقة. يتم تحليل اللون الناتج باستخدام أجهزة استشعار ضوئية دقيقة (Optical Sensors)، التي تقوم بتحليل شدة اللون وتربطها بتركيز الألبومين في العينة. هذا النوع من التحليل اللوني لا يحتاج إلى كميات كبيرة من المواد الكيميائية، ويعتبر سريعاً وفعالاً للكشف الروتيني عن الألبومين. [10]

3. النظم المدمجة في رقاقة (Lab-on-a-Chip) : واحدة من أهم ميزات الموائع الدقيقة هي القدرة على دمج عدة مراحل من التحليل على شريحة واحدة. "مختبر على رقاقة" هو مصطلح يشير إلى نظام مصغر يحتوي على جميع المكونات المطلوبة للتحليل البيولوجي أو الكيميائي. يمكن لرقاقة الموائع الدقيقة أن تحتوي على كل من المكونات اللازمة لتحضير العينة، ومعالجة العينات، والكشف عن الألبومين. في بعض الحالات، يمكن حتى دمج مراحل مثل تنقية العينة وفصل البروتينات المختلفة، مما يتيح الكشف الكمي والدقيق عن الألبومين دون الحاجة إلى مراحل خارجية معقدة. [9]



صورة (1-1) رقاقات الموائع الدقيقة المستخدمة في تقنية المختبر على رقاقة لتحليل العينات البيولوجية

أهمية تقنية الموائع الدقيقة في المجال الطبي:

من خلال تقليص حجم الأجهزة التحليلية ودمج عدة عمليات في منصة واحدة، تساعد الموائع الدقيقة على تحسين سرعة التشخيص وتقليل تكلفة التحليلات البيولوجية، يتيح ذلك تقديم خدمات طبية أسرع وأكثر دقة، خاصة في مجالات الطب الشخصي والرعاية الوقائية، في حالة الكشف عن الألبومين، يمكن للموائع الدقيقة أن تكون أداة مهمة لتشخيص مشاكل الكلى في مراحلها المبكرة، مما يساعد على تقليل الأضرار المزمنة والمضاعفات المحتملة. [10]

التقدير الكمي واللوني للألبومين:

هو من أهم الوسائل التحليلية لتحديد تركيز الألبومين في العينات البيولوجية، خصوصاً في تشخيص أمراض الكلى، وكما ذكرنا سابقاً أن زيادة تركيز الألبومين في البول قد تشير إلى مشاكل في وظيفة الكلى.

التقدير الكمي للألبومين (Quantitative estimation of albumin) :

في هذه الطريقة، يتم قياس كمية الألبومين باستخدام التحليل الكمي، وأحد أكثر الأساليب شيوعاً هو التحليل الطيفي (Spectrophotometry) الذي يعتمد على امتصاص الألبومين لضوء عند طول موجي معين. يتم استخدام كاشف معين يتفاعل مع الألبومين لتكوين لون يمكن قياسه باستخدام جهاز طيفي.

الخطوات الرئيسية للتقدير الكمي:

- ① إعداد المحاليل القياسية: تُحضّر سلسلة من المحاليل القياسية للألبومين بتركيز معروفة.
- ② إضافة الكاشف الملون: يتم إضافة كاشف يتفاعل مع الألبومين مثل "بروموكريسول الأخضر (BCG)"، الذي يتفاعل مع الألبومين لتكوين لون أخضر.
- ③ قياس الامتصاص: يتم قياس امتصاص الضوء عند طول موجي محدد (عادة 630 نانومتر) باستخدام جهاز الطيف الضوئي.
- ④ رسم منحنى المعايرة: رسم العلاقة بين الامتصاصية والتركيز باستخدام المحاليل القياسية، ثم تحديد تركيز الألبومين في العينات المجهولة بناءً على هذا المنحنى. [12]

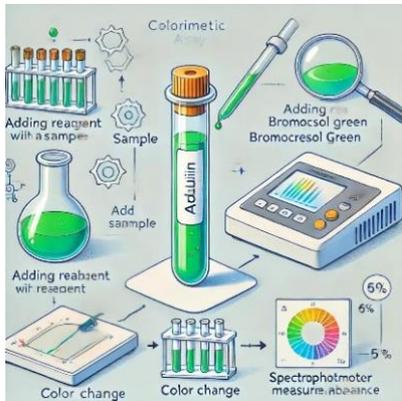
التقدير اللوني (Colorimetric Assay):

يعتمد على تكوين لون محدد عند تفاعل الألبومين مع كاشف كيميائي، ويستخدم الطيف المرئي لقياس شدة التغير في اللون، الذي يكون متناسباً مع تركيز الألبومين في العينة. الكواشف الرئيسية المستخدمة تشمل:

➤ بروموكريسول الأخضر (BCG): يُكوّن لوناً أخضر عند تفاعله مع الألبومين.

➤ بروموكريسول البنفسجي (BCIP): يُكوّن لوناً مختلفاً ويعتمد في تفاعله على تركيز

الألبومين.



في هذه الصورة، يظهر جهاز قياس الامتصاص الضوئي المستخدم للكشف عن الألبومين. يتم وضع عينة الدم أو البول المحتوية على الألبومين في الأنبوب وإضافة الكاشف اللوني بعد ذلك يتم قياس امتصاص العينة للضوء باستخدام جهاز القياس لتحديد تركيز الألبومين بناءً على تغير اللون. [12]

صورة (٢-١) الكشف عن الألبومين باستخدام الطريقة اللونية"

★ استخدام (BSA) Bovine Serum Albumin

بالإضافة إلى الكواشف السابقة، يُعتبر BSA كاشفاً قياسيماً مهماً يُستخدم في التقدير الكمي للألبومين في الأبحاث البيو كيميائية. يتم استخدامه لإعداد محاليل قياسية لتحديد تركيز الألبومين في العينة من خلال مقارنة النتائج مع منحنى المعايرة الناتج عن BSA. [13]

- التقدير الكمي واللوني للألبومين باستخدام كواشف مثل BCG و BCIP إلى جانب BSA كمعيار مرجعي، هو طريقة فعالة ودقيقة لتحديد تركيز الألبومين في العينات السريية. بالإضافة إلى ذلك، يوفر استخدام الجسيمات النانوية النحاسية (CuNPs) دقة أكبر في القياس ويمثل تطوراً في تقنيات التقدير الطيفي. [6]

هدف البحث:

يهدف هذا البحث إلى تطوير مستشعر نانوي مبني على جسيمات النحاس النانوية (Copper Nanoparticles) لتقدير تركيز الألبومين في عينات البول، مما يسهم في الكشف المبكر عن مؤشرات تلف الكلى، مثل الميكروألبومينوريا، وذلك باستخدام وسيلة تحليلية تتسم بالكفاءة العالية، والحساسية، وسهولة التطبيق، وانخفاض الكلفة.

كما يسعى البحث إلى إبراز دور تقنية النانو تكنولوجي في التطبيقات الطبية، وخصوصاً في تشخيص أمراض الكلى بطريقة أكثر دقة وسرعة مقارنة بالطرق التقليدية، مما يعزز فرص التدخل العلاجي المبكر والحد من تطور المرض إلى مراحل متقدمة.

المواد وطرق العمل

Materials & methods

الاجهزة والادوات المستخدمة :Equipment and tools used

- كأس زجاجي (Beakers)
- أسطوانات حجمية (Volumetric Cylinders)
- ماصة دقيقة (Micropipette)
- ماصة مدرجة (Graduated pipette)
- ميزان إلكتروني (Electronic Balance)
- قناني حجمية سعة 25 مل (5 قناني)
- قناني حجمية سعة 100 مل (2 قنينة)
- سخان كهربائي (Hot Plate)
- محرك مغناطيسي (Magnetic Stirrer)
- ورق ترشيح + قمع ترشيح (Filter Paper + Funnel)
- دورق مخروطي (Conical flasks)

المواد الكيميائية : Chemical materials

- كبريتات النحاس الثنائي ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- هيدروكسيد الصوديوم NaOH
- هايدرازين هيدريت ($\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- محلول BSA (Bovine Serum Albumin)
- ماء مقطر (distilled water)
- اللبان (Boswellia sacra)

طريقة العمل :Experimental Procedure

• تحضير المستشعر النانوي من جسيمات النحاس النانوية (CuNPs)

1. تحضير محلول كبريتات النحاس (CuSO_4):

تم إذابة كمية محسوبة من ملح CuSO_4 بتركيز 0.1 مولاري في 100 مل من الماء المقطر، باستخدام قانون المولارية ($M = n/V$) لحساب الكمية المطلوبة. شكل (٢-١)

2. تحضير محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH):

تم تحضير محلول NaOH بتركيز 0.1 مولاري وتخفيفه إلى الحجم المطلوب باستخدام الماء المقطر داخل قنينة حجمها ٢٥ مل. شكل (٢-٢)

3. تحضير محلول (*Boswellia sacra*):

تم إذابة 1 غرام من العلك المر في 100 مل من الماء المقطر مع التحريك المستمر، للحصول على محلول تركيزه 1%. شكل (٢-٣)

4. تكوين الجسيمات النانوية (CuNPs):

تم خلط 10 مل من محلول CuSO_4 مع ١٦ مل من NaOH بتركيز 0.01 مولاري.

ثم أضيف ١6 مل من محلول BS بتركيز 1%، تمزج المكونات لمدة ٥ دقائق

سخن المزيج على درجة حرارة 70°C مع التحريك، أضيف بعد ذلك ٦ مل من محلول الهيدرازين.

لوحظ تغير اللون إلى الأحمر الداكن، مما يدل على تكوين جسيمات النحاس النانوية. شكل (٣-٤)

• تحضير محلول الألبومين القياسي (BSA) Bovine serum albumin:

تم إذابة كمية من مسحوق الألبومين البقري (BSA) للحصول على محلول بتركيز 500 ppm.

ثم تم إجراء تخفيفات للحصول على تراكيز أقل من أجل رسم المنحني القياسي تم اخذ التراكيز التالية: (١٠، ٧، ٥، ٣، ٢، ١). شكل (٣-٥)

• تحليل الامتصاصية باستخدام جهاز UV-Vis:

تم قياس الامتصاصية لكل محلول باستخدام الجهاز، وتحديد الطول الموجي λ_{max} لمحلول CuSO_4 (ظهر عند 589 نانومتر).

بعدها تم قياس امتصاصية المحاليل المحتوية على BSA عند نفس الطول الموجي لرسم المنحني القياسي.

• تحليل عينات البول (Urine):

تم أخذ 100 ميكرو لتر من عينات البول الحقيقية ومزج كل عينه مع ١ مل من CuNPs، وتم تخفيفها في الماء المقطر وقياس الامتصاصية، من خلال القراءات، تم حساب تركيز الألبومين في كل عينة باستخدام معادلة المنحني القياسي شكل (2-6)



شكل (٢-٢) محلول هيدروكسيد الصوديوم



شكل (٢-١) محلول كبريتات النحاس الثنائي



شكل (٢-٤) تكوين الجسيمات النانوية



شكل (٢-٣) محلول BS



شكل (2-6) عينات الادرار Urine

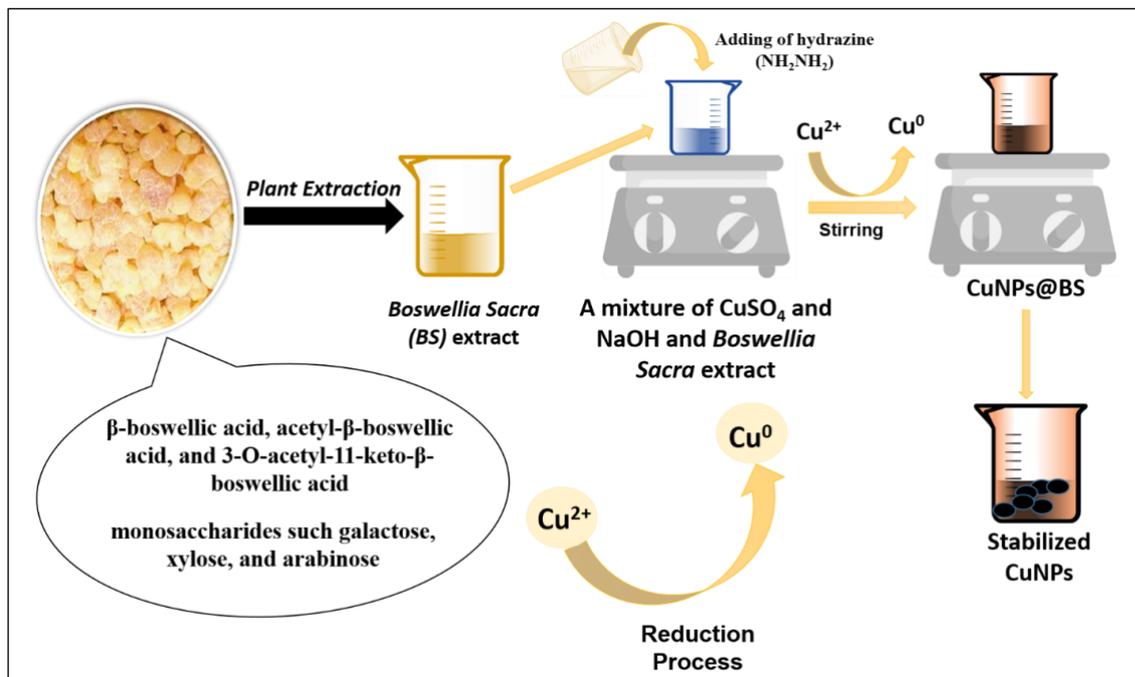


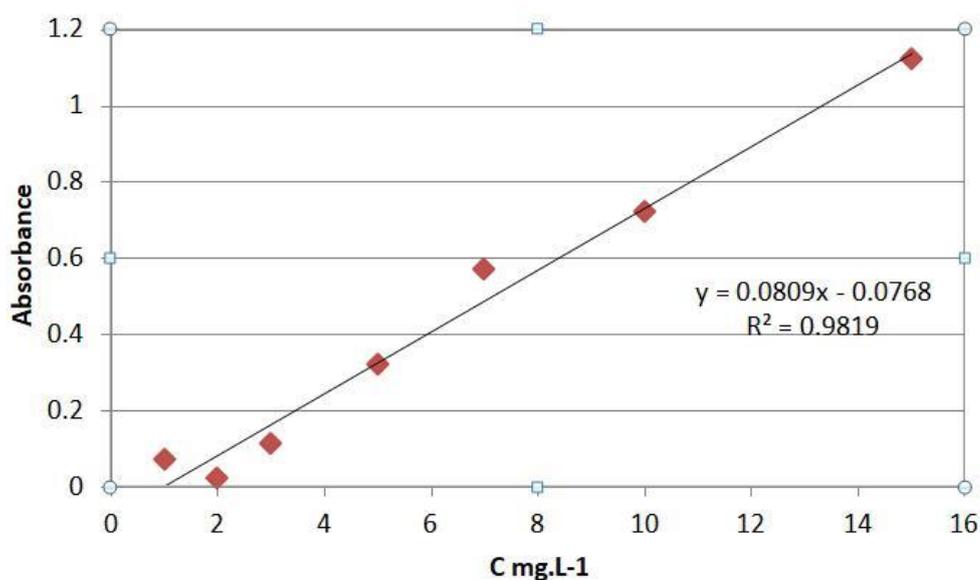
شكل (2-5) مسحوق BSA والمحلول المركز والمحاليل المخففة

النتائج The Results

1. تصنيع مستشعرات جسيمات النانو النحاسية (CuNPs@BS)

جوهر تقنية النانو، وهو علمٌ واعد، يكمن في عملية بسيطةٍ ومنخفضة التكلفةٍ وصديقةٍ للبيئة، لإنتاج جسيماتٍ نانويةٍ باستخدام مواردٍ طبيعيةٍ خضراء. على مدى السنوات القليلة الماضية، أُنتج عددٌ كبيرٌ من الجسيمات النانوية المعدنية، مثل النحاس والفضة والسيلينيوم والتيتانيوم، باستخدام آلية الاختزال الأخضر في النباتات التي تُعدّ مكوناتٍ بيولوجيةً فعّالة. يحتوي النبات على مجموعة متنوعة من المكونات الأساسية، مثل الجليكوسيدات، والأحماض الكربوكسيلية، والبروتينات، والسكريات المتعددة، والفلافونويدات، بالإضافة إلى عوامل الترطيب وكمية صغيرة من المعادن. درست مجموعتنا الحراسي وحامدبور محتويات اللبان نظراً لأهميته الحيوية العالية. ووفقاً لبياناتهما المنشورة، يحتوي اللبان على عوامل اختزال على شكل حمض بينا-بوسويليك، وحمض أسيتيل-بينا-بوسويليك، وحمض 3-O-أسيتيل-11-كيتو-بينا-بوسويليك. يحتوي اللبان على سكريات أحادية مثل الجلاكتوز، والزيلوز، والأرابينوز، بالإضافة إلى مواد كيميائية فعالة مهمة مشتقة من أحماض اللبان، وفقاً لدراسة أخرى أجراها مانينو وآخرون. استخدم تحليل HPLC. وبالتالي، باستخدام كيريتات النحاس كمادة أولية، استُخدمت قدرة مستخلص البوزويليا على الاختزال لتخليق جسيمات النانو النحاسية. يُرجع المحتوى العالي من مجموعات الاختزال في مستخلص البوزويليا إلى أحماض البوزويليا والسكريات الأحادية، التي يعتمد تركيبها على فلافونويد هيدروكسي ذي نسبة عالية من مجموعات الهيدروكسيل. يعتمد اختزال أيونات المعادن إلى جسيمات نانوية على هذه التركيبة. لذلك، تُعدّ أحماض البوزويليا والسكريات الأحادية مسؤولة عن تخليق جسيمات النانو النحاسية (الشكل 3-1). وقد تم إثبات صحة الفرضية القائمة على استخدام المستخلصات النباتية لاختزال أيونات معدنية مختلفة، مثل Cu^{2+} ، و Zn^{2+} ، و Se^{2+} ، و Ti^{4+} ، و Fe^{3+} ، من خلال عدد من التقارير المنشورة.





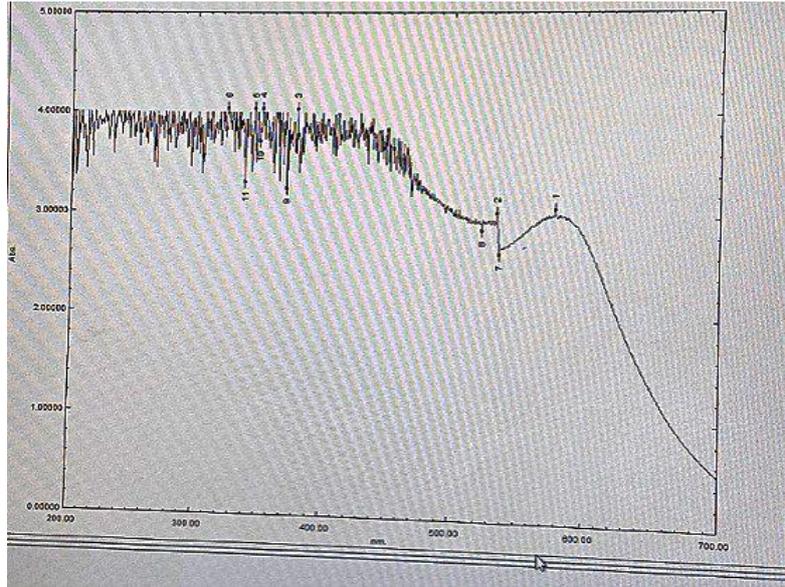
Calibration Curve Based on Absorbance Measurements of BSA Standard Solutions at Known Concentrations"

يوضح هذا المنحني العلاقة بين الامتصاصية وتركيز الألبومين في المحاليل القياسية المخففة.

| Sample | Absorption |
|--------------|------------|
| العينة رقم 1 | 0.13 |
| العينة رقم 2 | 0.1 |
| العينة رقم 3 | 0.06 |
| العينة رقم 4 | 0.08 |
| العينة رقم 5 | 0.07 |
| العينة رقم 6 | 0.064 |

"Absorbance of Urine Samples After Adding the Nanosensor"

تمثل الامتصاصية تركيز الألبومين المخفف بعد تفاعله مع مستشعر النحاس النانوي



الصورة توضح القمة للطول الموجي الأقصى λ_{max} عند 589 nm



جهاز UV-Visible Spectrophotometer

The Calculation الحسابات

1. من خلال معادلة منحنى المعايرة نحسب التركيز المخفف للألبومين بعد اضافة الادرار الى الخلية .

2. من خلال قانون التخفيف نستخرج التركيز الاصلي.

$$y=0.0809 x - 0.0768$$

sample 1

$$0.13=0.0809x - 0.0768$$

$$X=2.556\text{ppm} \quad \text{التركيز المخفف}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C_1 \times 0.1 = 2.556 \times 5$$

$$C_1 = 127.8\text{ppm} \quad \text{التركيز الاصلي}$$

Sample 2

$$0.1=0.0809x - 0.0768$$

$$X=2.185 \text{ ppm}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C_1 \times 0.1 = 2.185 \times 5$$

$$C_1 = 109.25\text{ppm}$$

sample 3

$$0.06=0.0809x - 0.0768$$

$$X=1.96 \text{ ppm}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C_1 \times 0.1 = 1.96 \times 5$$

$$C_1 = 84.5 \text{ ppm}$$

Sample 4

$$0.08 = 0.0809x - 0.0768$$

$$X = 1.938 \text{ ppm}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C_1 \times 0.1 = 1.938 \times 5$$

$$C_1 = 96.9 \text{ ppm}$$

sample 5

$$0.07 = 0.0809x - 0.0768$$

$$X = 1.814 \text{ ppm}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C_1 \times 0.1 = 1.814 \times 5$$

$$C_1 = 90.7 \text{ ppm}$$

Sample 6

$$0.064 = 0.0809x - 0.0768$$

$$X = 1.7404 \text{ ppm}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C_1 \times 0.1 = 1.7404 \times 5$$

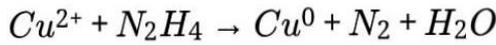
$$C_1 = 87.02 \text{ ppm}$$

المناقشة Discussion

إن تحضير مستشعر نانوي فعال باستخدام جسيمات النحاس النانوية CuNPs يتطلب ضبطاً دقيقاً للظروف الكيميائية لضمان تكوين جسيمات مستقرة وفعالة من حيث التفاعل مع الألبومين. وفي هذا الإطار، تم اختيار مجموعة من المواد والظروف بعناية بناءً على خصائصها الكيميائية والوظيفية، كما يلي:

أولاً: استخدام هايدرازين هيدرات (N₂H₄·H₂O) كعامل مختزل:

يُعد الهايدرازين أحد أقوى العوامل المختزلة المستخدمة في الكيمياء النانوية، حيث يتميز بقدرته العالية على تقليل أيونات النحاس (Cu²⁺) إلى الحالة الصفيرية (Cu⁰)، وهي الصورة النقية التي تُشكل الأساس لجسيمات CuNPs. يتم هذا التفاعل وفقاً للمعادلة العامة:



ويتميز الهايدرازين بسرعة اختزاله وانتقائيته العالية، مما يجعله مثاليًا لتكوين جسيمات متجانسة الحجم، وهو أمر ضروري لحساسية المستشعر.

ثانيًا: استخدام اللبان (Boswellia sacra) كمادة مثبتة ومحفزة:

علك المر هو مادة طبيعية تحتوي على مركبات بوليفينولية وتربينية، وهذه المركبات تعمل كمثبتات (Capping Agents) للجسيمات النانوية. دورها مهم جدًا لأنها:

- تمنع التكتل (aggregation) بين الجسيمات النانوية حيث توّطر بالمكونات الطبيعية.
 - تساهم في زيادة استقرار الجسيمات في الوسط المائي.
 - قد تضيف نشاطًا بيولوجيًا إضافيًا للمستشعر، مما يُعزز حساسيته تجاه البروتينات.
- هذا ما يسمى بالتخليق الأخضر (Green Synthesis) باستخدام مستخلصات نباتية بدلاً من المواد الكيميائية السامة.

ثالثًا: استخدام وسط قاعدي (NaOH):

تم استخدام هيدروكسيد الصوديوم لضبط قيمة pH في الوسط أثناء تكوين الجسيمات، وذلك لعدة أسباب مهمة:

1. تحفيز تفاعل الاختزال: التفاعل بين الهايدرازين وأيونات النحاس يتم بكفاءة أكبر في وسط قاعدي، حيث تزداد كفاءة التفاعل وتحسن سرعة تكوين CuNPs.
2. منع أكسدة Cu⁰ إلى Cu²⁺ من جديد: البيئة القاعدية تُساعد على الحفاظ على النحاس في حالته الصفيرية من خلال تقليل وجود البروتونات (H⁺) التي قد تعيد أكسدته.
3. تحسين تجانس التفاعل: الوسط القاعدي يُعزز من تفاعل Cu²⁺ مع العوامل المثبتة مثل العلك المر، مما يساهم في تكوين جسيمات مستقرة وموحدة الحجم.

أيضًا، تم اختيار تركيز CuSO_4 و NaOH و N_2H_4 بدقة للحصول على نسبة مولارية مثالية تتيح تكوين جسيمات نانوية بحجم مناسب، لأن الحجم يؤثر مباشرة في الامتصاصية وكفاءة التفاعل مع البروتين.

خامسًا: تأكيد فعالية المستشعر بالنتائج الطيفية:

تم رصد الامتصاص عند 589 نانومتر، وهو مؤشر واضح على تكوين CuNPs. بعدها، التغيير في الامتصاص عند إضافة عينات الألبومين يثبت أن الجسيمات تفاعلت بالفعل مع البروتين، وأنتجت استجابة طيفية يمكن تحليلها. هذا يعني أن المستشعر لا يكتفي برصد وجود البروتين فقط، بل يقيس تركيزه بدقة أيضًا.

في تجربتنا تم إضافة كمية من عينة الادرار التي تحتوي على الألبومين إلى كمية من محلول يحتوي على جسيمات نانوية من كبريتات النحاس، إذا كان الألبومين موجودًا في العينة، فإنه يتفاعل ويرتبط بسطح الجسيمات النانوية من كبريتات النحاس.

عند قياس الامتصاصية الطيفية لجسيمات النحاس النانوية CuNPs كمستشعر نانوي قبل وبعد إضافة عينات الادرار الحاوية على الألبومين، لاحظنا أن الامتصاصية انخفضت بمقدار 0,1 بشكل واضح بعد إضافة عينات الإدرار إلى المستشعر، وتكرر هذا الانخفاض تكرر في كل العينات وبدرجات مختلفة، وهو ما يشير إلى تفاعل كيميائي حصل بين مكونات الادرار (وخاصة الألبومين) وبين جسيمات CuNPs.

يُعزى هذا التغيير إلى أن بروتين الألبومين يحتوي على مجموعات وظيفية مثل NH_2 و COOH ، والتي عند إضافتها إلى المستشعر ترتبط بجسيمات CuNPs وتقوم بتغليفها (Capping) أو تعديل سطحها النشط، مما يؤدي إلى منع التفاعل الكامل للجسيمات مع الضوء وبالتالي تقليل الامتصاصية.

هذا التأثير الطيفي يعتبر مؤشرًا مهمًا على وجود الألبومين في العينة، إذ إن الفرق بين الامتصاصية قبل وبعد إضافة البول يمثل استجابة نوعية للمستشعر.

وتُظهر هذه القيم أن كلما زادت كمية الألبومين في البول، ازداد التأثير على جسيمات CuNPs، وبالتالي زادت قيمة الفرق في الامتصاصية. وهذا يثبت أن المستشعر النانوي حساس بشكل ملحوظ لوجود الألبومين حتى بتركيزات صغيرة.

الاستنتاجات Conclusions

يظهر هذا البحث إمكانية واقعية وواعدة لاستخدام جسيمات النحاس النانوية (CuNPs) كمستشعر نانوي فعال للكشف عن بروتين الألبومين في البول، كأحد أهم المؤشرات الحيوية لأمراض الكلى ومن خلال التخليق الأخضر باستخدام مستخلص اللبان كمادة مختزلة ومثبتة، تمكنا من إنتاج جسيمات نانوية مستقرة وفعالة بيولوجياً بطريقة صديقة للبيئة ومنخفضة الكلفة.

أثبتت التجارب أن المستشعر المستحدث قادر على التفاعل مع الألبومين بانتقائية عالية، مما أدى إلى تغيير ملحوظ في الامتصاصية، يمكن الاعتماد عليه في التقدير الكمي للألبومين بدقة. هذا يعزز إمكانيات استخدام هذا المستشعر في التطبيقات التشخيصية الطبية، خصوصاً في البيئات ذات الموارد المحدودة، ويُعدّ الطريق لتطوير أجهزة تحليل نانوية متكاملة وذكية.

ما يُميز هذا المستشعر النانوي هو بساطته، حساسيته العالية، وعدم الحاجة إلى تقنيات مكلفة أو تعقيدات تشغيلية، مما يجعله أداة مثالية للفحص الميداني السريع.

وقد أظهر قدرة واضحة على اكتشاف تغيرات طفيفة في تركيز الألبومين، وهو ما يمنح الأطباء نافذة للكشف المبكر عن الميكروألبومينوريا، وهي المرحلة التي يكون فيها التدخل العلاجي أكثر فعالية.

تشير هذه النتائج إلى أن تكنولوجيا النانو، إذا طُبقت بحكمة، يمكن أن تُحدث تحولاً جذرياً في مستقبل تشخيص أمراض الكلى، ليس فقط من خلال تحسين دقة التحليل، بل من خلال جعل هذه التقنيات متاحة وسهلة الاستخدام على نطاق واسع، وهو ما يمثل خطوة نحو طب تشخيصي أكثر ذكاءً وإنصافاً.

References المصادر

1. Whitesides, G. M. (2003). The 'right' size in nanobiotechnology. *Nature Biotechnology*, 21(10), 1161-1165.
2. Bhushan, B. (Ed.). (2010). *Springer handbook of nanotechnology* (3rd ed.). Springer.
3. Rai, V., Acharya, S., & Dey, N. (2015). Nano sensors: A paradigm shift in biomedical diagnostics. *ACS Nano*, 9(1), 101-110.
4. Wang, J. (2005). Electrochemical nanosensors for biological detection. *Electroanalysis*, 17(1), 7-14.
5. Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2001). *Electrochemical methods: Fundamentals and applications* (2nd ed.). Wiley.
6. *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry, Advances In nanoparticle Based sensor for Protein Detection.*
7. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* Burtis, C.A. et al., 2012.
8. *Clinical Chemistry: Principles, Techniques, and Correlations* Bishop, M.L., et al., 2017.
9. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. von Stetten, and R. Zengerle "Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications," *Chemical Society Reviews*, vol. 39, no. 4, pp. 1153-1182, 2010 .
10. J. Zeng, J. Zhang, "Recent Advances In Microfluidic Platforms for Detecting Biomarkers," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 56, pp. 95-105, 2014.

11. P. Abgrall, A. M. Gué, "Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling It into a complete microsystem—A review," Journal of Micromechanics and Microengineering, vol. 17, no. 5, pp. R15-R49, 2007.

12. "Quantitative Determination of Albumin Using Bromocresol Green Method and Bovine Serum Albumin Standard". (Journal of Clinical Laboratory Analysis).

13. "Use of Bovine Serum Albumin In Nanoparticle-Assisted Detection of Proteins". (Journal of Nanotechnology and Biosensors).

14.

<https://altibbi.com/%D8%A7%D9%84%D9%81%D8%AD%D9%88%D8%B5%D8%A7%D8%AA-%D9%88%D8%A7%D9%84%D8%AA%D8%AD%D8%A7%D9%84%D9%8A%D9%84/%D8%A7%D9%84%D8%A8%D9%8A%D9%84%D8%A9-%D8%A7%D9%84%D8%A7%D9%84%D8%A8%D9%88%D9%85%D9%8A%D9%86%D9%8A%D8%A9-%D8%A7%D9%84%D8%B2%D9%87%D9%8A%D8%AF%D8%A9-12>