Synthesizing and characterization of magnetic Mesoporous silica nanocomposite for medical application and investigating their cytotoxicity

Foroogh Toubi¹, Ayyoob Arpanaei², Abdolkhalegh Deezaji³, Mohammad Ali Oghabian⁴, Seyed Safa-Ali Fatemi²

¹ PhD Student, Department of Chemical Engineering, Babol Noshirvani University of Technology, Babol, Iran ² Assistant Professor, Department of Environmental and Industrial Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Department of Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran ⁴ Associate Professor, Research Center for Molecular and Cellular Imaging, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received January 12, 2014; Accepted April 20, 2014)

Abstract

Background and purpose: One of the most important challenges in nanomedicine is timely diagnosis and effective treatment of chronic disease. The aim of this research was to synthesize and characterize 3-layered magnetic silica nanocomposite with simultaneous application as a contrast agent in magnetic resonance imaging (MRI) and for drug delivery.

Materials and methods: In this research, magnetite iron oxide nanoparticles by co-precipitation method, first layer of silica by a method similar to Stober method and second layer (mesoporous silica) by removing template method were produced. Existence or deletion of surfactant molecules by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy, particle size and morphology of particles by high resolution scanning transmission electron microscopy (HR-STEM), magnetic properties of particles by vibrating sample magnetometer (VSM) instrument, mesoporous structure by Brunauer-Emmett-Teller (BET) method and also crystalline structure of nanocomposite by X-Ray diffraction (XRD) method were investigated. Diphenyltetrazolium bromide (MTT) and lactate dehydrogenase (LDH) assays were used to study cytotoxicity of the produced particles.

Results: Produced 3-layered nanocomposite had the size of 180 ± 10 nm, specific area and average pore diameter of 390.4m2/gand 3.01 nm, respectively. The saturation magnetization value of nanocomposite was 21 ± 0.5 emu/g. Cell cytotoxicity of nanocomposite with human prostate carcinoma epithelial-like cell line Du-145 and erythroleukemia cells K562 were reviewed. The results revealed that synthesized nanocomposite enhanced no cytotoxicity in tested concentrations.

Conclusion: The result of present study illustrated that produced nanocomposite has preliminary essential capability to be used as MR imaging agent and drug delivery system.

Keywords: Magnetite nanoparticle, mesoporous silica, nanocomposite

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(112): 9-22 (Persian).



مجــلـــه دانـشـــگاه عــلـــوه پــزشــگـــی مــازنـــدران دوره بیست و چهاره شماره ۱۱۱ اردیبهشت سال ۱۹۹۷ (۷۹ــ۹)

ساخت و تعیین ویژگی ذرات نانوکامپوزیتی متخلخل سیلیکای مغناطیسی برای کاربر دهای پز شکی و برر سی سمیت سلولی آنها

فروغ توبی^۱ ایوب آرپنایی^۲ عبدالخالق دیزجی^۳ محمدعلی عقابیان^۴ سید صفاعلی فاطمی^۲

چکیدہ

سابقه و هدف: تشخیص به موقع و درمان مؤثر بیماریهای صعبالعلاج از چالشهای بسیار مهم در زمینه نانوپزشکی است. هـدف از این تحقیق، سنتز و تعیین ویژگیهای ذرات نانو کامپوزیتی سه لایه سیلیکای مغناطیسی با قابلیت به کارگیری همزمـان بـه عنـوان عامـل حاجب در تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI یا Magnetic resonance imaging) و دارورسانی بود.

مواد و روشها: در پژوهش حاضر نانوذرات اکسید آهن مگنتیت با روش همرسوبی شیمیایی، لایه اول سیلیکا با استفاده از روشی مشابه با روش Stober و لایه دوم (سیلیکای متخلخل) با روش حذف الگو ساخته شدند. حضور و حذف مولکول های سورفکتانت توسط آنالیز مادون قرمز تبدیل فوریه (Fourier transform infrared یا FTIR)، بررسی اندازه و مورفولوژی ذرات توسط تصویر برداری میکروسکوپ الکترونی عبوری-روبشی با قدرت تفکیک بالا (FTIR sample resolution-scanning transmission electron microscopy یا ال الکترونی عبوری-روبشی با قدرت تفکیک بالا (Vibrating sample manetometer)، خونه ارتعاشی (RTIR) یا Vibrating sample manetometer)، خصوصیات مغناطیسی ذرات توسط دستگاه مغناطیس سنج نمونه ارتعاشی (RTSTEM) روش (VSM)، ساختار متخلخل با استفاده از روش MTT (Brune Brunauer Jeustich) و ساختار بلوری نانوسامانه نیز با آنالیز تفرق اشعه ایکس (VSM Vibrating samption-scale) بررسی شد. سنجش های MTT (ARZ یا XRD)، ساختار میکروری دانوسامانه نیز با آنالیز تفرق اشعه ایکس (Lactate dehydrogenase) LDH

یافتهها: نانوسامانه سه لایه سنتز شده دارای اندازه ۱۰ ± ۱۸۰ نانومتر و مساحت ویژه و قطر متوسط حفره ذرات بـه ترتیب ۳۹۰/۶ مترمربع بر گرم و ۳/۰۱ نانومتر بود. مغناطش اشباع نانوسامانه برابر با ۲/۰ ± ۲۱ واحد الکترومغناطیس بر گرم به دست آمد. بررسی سمیت سلولی نانوسامانه بر دو دودمان سلولی سرطان پروستات اپی تلیال چسبنده ID–LD و سرطان خون اریترولوکمیک شناور Ko٦۲ انجام شد. نتایج بررسی سمیت سلولی نشان داد که نانوسامانه به دست آمده در غلظتهای آزمایش شده، سـمیت سلولی ایجاد نکردند.

استنتاج: نتایج این تحقیق نشان میدهد که نانوسامانه سنتز شده دارای قابلیتهای لازم اولیه برای بـه کـار گیری هـمزمـان بـه عنـوان عامل حاجب برای MRI و دارورسانی میباشد.

واژههای کلیدی: نانوذرات مگنتیت، سیلیکای مزومتخلخل، نانوسامانه

مقدمه

سرطان به عنوان دومین عامل مرگ و میر در جهان، یکی از بیماریهایی است که در آینده نزدیک روشهای شناسایی و

درمان آن با کاربرد نانوفن آوری در حوزه پزشکی (نانوپزشکی) دستخوش تغییرات قابل توجهی میشود (۱). نانوپزشکی در واقع کاربرد نانوفن آوری در نمایش، تشخیص،

🗫 تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۱۲/۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۳۹

مولف مسئول: ایوب آرپنائی – تهران: کیلومتر ۱۵ اتوبان تهران-کرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، بخش زیست فناوری صنعت و محیط زیست E-mail: aa@nigeb.ac.ir ۱. دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، نهران

۱. دانسجوی د کرده بو محکولوری، دانسکاه مهندسی شیمی، دانسکاه طبیعتی توسیروانی بابل، بابل، کهران

۲. استادیار، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران ۳. استادیار، پژوهشکده زیست فناوری مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۱٫۱۰ میلادیار) پروششان و پیشت شوری مورسی پروششان ملکی مهناسی رسین و ریست شوری، مهران ایران مرابع

۴. دانشیار، گروه آنالیز تصاویر بیومولکولی، مرکز تحقیقات تصویربرداری سلولی- مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

پیشگیری و درمان بیماری ها و بافت های بیمار در سامانه های زیستی است (۲). در دو ده ه اخیر تحقیقات زیادی در زمینه توسعه ابزار کارامد جهت تشخیص و درمان بر پایه نانوذرات در مورد سرطان، دیابت و بسیاری از بیماری های دیگر انجام شده است (۴، ۳). تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI یا شده است (۴، ۳). تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI یا قدر تمند در زمینه تشخیص می باشد. این تکنیک بر پایه قدر تمند در زمینه تشخیص می باشد. این تکنیک بر پایه می تواند امکان تشخیص زودهنگام سرطان و تصویربرداری در سطوح مولکولی را فراهم کند (۵).

عوامل حاجب رایج در MRI دارای معایبی از جمله سمیت، زمان كوتاه گردش در خون، حساسيت رديابي پايين و عدم قابليت عملکرد چندگانه هستند (۶). نانوذرات اکسید آهن از جمله مگنتیت (FerOs) با ساختار کوچک و دارا بودن خاصیت سوپرپارامغناطیسی، سمیت پایین، نیمه عمر بالا و خاصیت حاجبی بسيار خوب به عنوان تقويت كننده، كيفيت تصاوير MRI را بهبود می بخشند (۸ ۷). نانوذرات مگنتیت با روش های متنوعی از جمله همرسوبي، رسوبي- كاهشي، هيدروترمال، سل-ژل و... ساخته می شوند (۹). نانوذرات مگنتیت با توزیع اندازه باریک و محدوده اندازه ذرات حدود ۱۰ نانومتر را می توان با استفاده از روش همرسوبي شيميايي توليد كرد وباخوشهاي كردن نانوذرات مگنتیت تولید شده، مغناطیس پذیری آن ها را افزایش داد (۱۰). نانوخوشههای مگنتیت تولید شده می توانند با استفاده از روش تصحیح شده استوبر (Stober) به عنوان هسته هایی برای تراکم تترااتيل اورتوسيليكات (Tetraethyl orthosilicate يا TEOS) (ماده پیشساز سیلیکا) هیدرولیز شده عمل کنند و لایهای از سیلیکا برای محافظت از هسته مغناطیسی و افیزایش زیست سازگاری آن ایجاد کنند (۱۱).

از طرف دیگر، توسعه روش های انتقال هدفمند داروها به بافت موردنظر و مرتفع کردن مشکلات دارو درمانی مانند سمیت، حلالیت پایین، تجزیه محیطی و چرخه عمر از مهمترین زمینههای تحقیقات در دارورسانی به شمار میروند (۱۲). سامانههای انتقال دارو بر پایه نانوفن آوری به سبب تغییر فارموکنتیک دارو، افزایش

نیمه عمر چرخه سامانه ای دارو با کاهش مصونیت زایی، آزادسازی داروها با سرعت ثابت، کاهش اثرات جانبی با انتقال دارو به ناحیه همزمان و یا از بین بردن مقاومت دارویی به طور همزمان و کاهش سمیت دارو بهبود چشمگیری داشته اند (۱۴، ۱۴). در این میان با توجه به خواص منحصر به فرد سیلیکای متخلخل از جمله زیست ساز گاری، مساحت بالا و حجم حفره های بزرگ، تنظیم پذیر بودن اندازه حفره ها، قابلیت بار گذاری قابل توجه مولکول های دارویی، انعطاف پذیری در برابر اتصال گروه های شیمیایی مختلف بر روی سطح به منظور انتقال هدفمند دارو و پایداری شیمیایی، استفاده از ذرات یا لایه های سنتز شده از سیلیکای متخلخل به عنوان حامل های دارویی، این ماده می تواند بسیار سودمند باشد (۱۵).

با ترکیب خواص سطحی سیلیکای متخلخل و خواص مغناطیسی نانوذرات سوپرپارامغناطیس مگنتیت می توان به ساختارهایی با قابلیت چندگانه دست یافت. در سیستمهای زیستی، تجزیه نانوذرات توسط سلولهای فاگوسیتو تیک و زمان گردش در خون آنها به اندازه نانوذرات بستگی دارد (۱۶)؛ بنابراین اندازه بهینه برای نانوذرات کمتر از ۲۰۰ نانومتر می باشد. استفاده از نانوذرات در این محدوده اندازه از اپسونیزه شدن سریع ذرات جلوگیری می کند و زمان باقی ماندن آنها در جریان خون را افزایش میدهد (۸).

در برخی گزارش ها به منظور تولید نانوساختارهای متخلخل مغناطیسی، ابتدا شبکه متخلخل سیلیکا تشکیل شده است و سپس نانوذرات مغناطیسی درون این ساختارها تولید شدهاند که با توجه به اندازه و شکلشان می توانند دارای کاربردهای مختلفی باشند (۱۸، ۱۷). در این تحقیق نانوسامانه هایی با هسته - خوشه نانوذرات مگنتیت، پوسته داخلی سیلیکا و پوسته خارجی سیلیکای مزومتخلخل سنتز شدند و ویژگی های آن ها مورد بررسی قرار گرفت. هسته مغناطیسی تقویت شده در این نانوسامانه ها باعث بهبود قابلیت آن ها به منظور افزایش میزان روشنایی در تصویربرداری تشدید مغناطیسی و لایه خارجی مزومتخلخل سیلیکا ساختار مناسبی

برای بارگذاری دارو در اختیار می گذارند. در پایان، اثر سمیت نانوسامانه تولید شده بر دو دودمان سلولی بررسی گردید.

مواد و *ر*وشها

مواد

براي توليد نانوسامانه بـا هسـته- خوشـه نـانوذرات مگنتيـت و يوسته خارجي سيليكاي متخلخل، كلريـد آهـن ۲ و ۳ ظرفيتـي و به ترتيب ۴ و ۶ آبه، محلول آمونياک (۳۰-۲۸ دصد)، اولئيک اسید (۹۰ درصد)، تولوئن (۹۹/۹ درصد)، اتانول (۹۹/۹ درصد)، تترااتيل اورتوسيليكات، ستيل تـرىمتيل آمونيـوم برومايـد (Cetyl trimethyl ammonium bromide L CTAB) و دىمتيل سولفو كسايد (Dimethylsulfoxide يا DMSO) از شرکت آلمانی Merck خریداری شد. به منظور کشت س___لولى ني___ز مح___يط ه___اى كش___ت DMEM RPMI (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Roswell Park Memorial Institute)، سرم جنین گاوی Fetal یــا FBS) و تر کیـــــ bovine serum) پنی سیلین /استر پتو مایسین از شرکت Gibco آمریکا تهیه شدند. Sigma از شے کت 5-diphenyltetrazolium bromide) از ش آمريكا و كيت تشخيصي LDH (Lactate dehydrogenase) نيز از شركت زيست شيمي ايران خريداري شد. دودمان سلولي K۵۶۲ و سلولهای DU-۱۴۵ از بانک سلولی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فـن آوری تهیـه گردیـد. در همـه آزمایش ها آب دیونیزه مورد استفاده قرار گرفت.

سنتز نانوذرات مگنتيت

نانوذرات مگنتیت با استفاده از روش همرسوبی شیمیایی نمکهای کلرید آهن در محلول آمونیاک ساخته شد (۱۹) و لایهای از اولئیک اسید به منظور افزایش قابلیت پخش شدن نانوذرات مگنتیت در محلول آبی بر روی آنها تشکیل گردید (۲۱، ۲۰). به این منظور، نمکهای کلرید آهن ۲ و ۳ ظرفیتی با نسبت مولی ۲ به ۱ در ۶۰ میلیلیتر آب دیونیزه تحت گاز

نیتروژن با همزن مکانیکی سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه حل شدند. بعد از ۵ دقیقه به این محلول مقدار ۱/۰ میلی لیتر اولئیک اسید اضافه شد و واکنش همرسوبی شیمیایی با افزودن ۷/۷ میلی لیتر محلول آمونیاک صورت گرفت. مخلوط حاصل تا دمای ۸۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد و سپس مقدار ۴/۰ میلی لیتر اولئیک اسید نیز در ۴ نوبت و در مدت ۱۵ دقیقه به آن اضافه شد. واکنش برای مدت زمان ۳۰ دقیقه ادامه پیدا کرد و پس از آن مخلوط واکنش تحت نیتروژن تا دمای محیط سرد شد. نانو ذرات مگنتیت پوشیده شده با اولئیک اسید توسط آهان (با آب مغناطیسی جدا گردید و سه بار با آب دیونیزه شستشو داده شد.

ســنتز ذرات بــا ســاختار هســته- پوســته خوشــه نــانوذرات مگنتیت پوشیده شده با سیلیکا

نانوذرات مگنتیت پوشیده شده با اولئیک اسید با استفاده از یک روش اصلاح شده (۱۰)، به صورت خوشهای در آمد و به طور همزمان با لایهای از سیلیکا پوشانده شد. در این روش، در ابتدا مقدار ۷۵ میلی گرم از نانوذرات مگنتیت پخش شده در ۵ میلی لیتر تولوئن به مخلوطی از اتانول، آب دیونیزه و محلول آمونیاک به نسبت حجمی ۴ به ۱ و ۱ اضافه و در دمای محیط توسط همزن مکانیکی با سرعت ۳۵۰ دور بر دقیقه هم زده شد. بعد از اختلاط کامل، ۱ میلی لیتر TEOS آرام آرام در مدت ۴ میاعت ادامه پیدا کرد. سپس محصول توسط آهن ربای مغناطیسی جمع آوری و ابتدا سه بار با اتانول و سپس سه بار با آب دیونیزه شستشو داده شد.

ایجاد پوشش سیلیکای متخلخل بـر روی ذرات بـا سـاختار هسته- پوسته سیلیکای مغناطیسی

به منظور ایجاد لایه سیلیکای متخلخل بر روی ساختار هسته-پوسته تهیه شده در مرحله قبل، از روش حذف الگو استفاده شد (۲۲). به این منظور، ۱۵ گرم سورفکتانت CTAB به عنوان الگوی ساختار در مخلوطی از آب دیونیزه، اتانول و محلول آمونیاک به

نسبت حجمی ۵۵: ۲۰، بخش شد. سپس ۳۰ میلی گرم از نانوذرات تولید شده در مرحله قبل به مخلوط فوق اضافه و در دمای محیط به طور مکانیکی هم زده شد. پس از ۲۰ دقیقه، ۲۱، میلی لیتر TEOS به آن اضافه گردید و هم زدن به مدت ۶ ساعت برای کامل شدن واکنش ادامه پیدا کرد. محصول به دست آمده توسط آهنربای مغناطیسی جدا و با اتانول و آب به دفعات شستشو و سپس در آون دمای ۸۰ درجه سانتی گراد خشک شد. به منظور حذف CTAB و ایجاد ساختار متخلخل، نمونه سنتز شده در کوره با دمای ۲۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت کلسینه (Calcination) شد. محصول نهایی با آب دیونیزه چندین بار شستشو و برای تحلیل آماده گردید.

تعیین ویژگیهای نانوسامانه سنتز شده

اندازه و مورفولوژی نانوسامانه ساخته شده با استفاده از تصاوير HR-STEM (High resolution-scanning) transmission electron microscopy) به دست آمده از میکروسکوپ Philips CM۲۰۰-FEG بررسی شد. اندازه ذرات و ضخامت لايه ها با استفاده از نرمافزار آناليز تصوير از تصاویر متعدد و بر اساس اندازه گیری حداقل ۱۰۰ نانوذره محاسبه گردید. به منظور بررسی ساختار شیمیایی ذرات سنتز شده، آناليز تفرق اشعه ايكس (X-Ray diffraction يا XRD) با استفاده از دستگاه Brucker DA انجام شد. حذف مولكول هاى CTAB بعد از كلسينه كردن با استفاده از آناليز Fourier transform infrared) FTIR) مورد بررسی قرار گرفت. مشخصات تخلخل سطح نانوسامانه با استفاده از روش Brunauer–Emmett–Teller) BET) و Barrett-Joyner-Halenda) BJH) از نمودارهای جذب ایزوترم آنالیز گر Belsorp minill تعیین گردید. خواص مغناطیسیی نیمی نیمی اسی اسی است از دسی تگاه VSM (Vibrating sample magnetometer) بررسی شدند.

کشت سلول سلولهای اپی تلیال چسبنده سرطان پروستات DU-۱۴۵ در

محیط کشت DMEM و سلول های اریترولو کمیک شناور سرطان خون K۵۶۲ در محیط کشت RPMI۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد FBS (که به ترتیب حاوی ۱۲۰ و ۲۲۰ میلی گرم در لیتر پنی سیلین و استرپتومایسین بودند)، کشت داده شدند و در انکوباتور با شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن، ۵۹ درصد رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. هفته ای یک بار واکشت سلولی انجام و از تریپان بلو (تریپان آبی) برای شمارش سلول های زنده استفاده شد.

مطالعات سميت سلولي

سنجش MTT یک روش رنگ سنجی استاندارد و نشان دهنده میزان قابلیت زنده ماندن سلولها از طریق اندازه گیری فعالیت آنزیمهای احیا کننده MTT به فورمازان بنفش رنگ نامحلول در آب است (۲۳). به منظور سنجش سمیت نانوسامانه تولید شده در مجاورت دو دودمان سلولی مختلف شناور و چسبنده K۵۶۲ و DU-۱۴۵، تعداد ۲۰^۴ ۲۰ × ۲ از هر یک از سلولها به درون حفرههای دو پلیت ۹۶ خانهای مجزا انتقال داده شدند و در انکوباتور با شرایط ذکر شده قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، مقدار ۱۰ میکرولیتر از غلظتهای ۱، ۱۰، ۴۰، ۱۰۱ و ۲۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر نانوسامانه در بافر فسفات به هر یک از حفرهها اضافه گردید و پلیتها برای ۲۴ ساعت دیگر در انکوباتور قرار گرفتند. پس از آن، ۱۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی گرم در میلیلیتر MTT به هـر یـک از حفرهها اضافه و به مدت ۴ ساعت دیگر در انکوباتور قرار داده شدند. سپس محلول رویمی با سانتریفوژ کردن خارج و مقدار ۱۰۰ میکرو گرم ماده DMSO به هر حفره اضافه شد. بعد از ۱۵ دقیقه تکان خوردن، مقدار جذب نوری محلول بنفش رنگ ایجاد شده در طول موج ۵۸۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA reader خوانده شد.

سنجش LDH روش کالریمتری قابل اعتمادی است که با اندازه گیری فعالیت آنزیم LDH در یک کشت، میزان مرگ و میر سلولی را نشان میدهد. آسیب دیدن سلول ها باعث افزایش مقدار LDH در سرم و یا محیط سلولی می شود.

دستورالعمل استفاده از کیت ها توسط شر کت های سازنده آن ها ارایه شده است. واکنش اکسایش – کاهش معرف های کیت توسط HDL آزاد شده کاتالیز گردید؛ بنابراین سرعت واکنش با فعالیت HDH در محیط سلول نسبت مستقیم دارد. بعد از قرار گرفتن سلول ها در مجاورت غلظت های مختلف از نانوسامانه به مدت ۲۴ ساعت مطابق با شرایط به کار برده شده برای تحلیل MTT، مقدار ۱۰۰۰ میکرولیت را زسرم روی بررسی قرار گرفت. مقدار جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه UV-Vis Spectrometer اندازه گیری و محاسبات مربوطه برای محاسبه نسبت تعداد سلول های مرده به تعداد کل سلول ها انجام شد.

يافتهها

تعیین ویژگیهای ذرات نانو کامپوزیتی سنتر شده تصویر شماره ۱، نمای HR-STEM نانوذرات مگنتیت کروی شکل منفرد تولید شده با اندازه میانگین ۰/۹ ± ۷/۷ نانومتر را نشان میدهد. این نانوذرات با استفاده از روش همرسوبی شیمیایی از کاهش نمکهای آهن دو و سه ظرفیتی در حضور آمونیاک به عنوان کاتالیزور و با حضور گاز نیتروژن به منظور جلوگیری از اکسایش در زمان انجام واکنش، تولید شدند. نانوذرات مگنتیت به دلیل برهم کنشهای دوقطبی- دوقطبی و نیروهای واندروالس بین نانوذرات مگنتیت

و نیز کاهش انرژی سطحی تمایل زیادی به تجمع دارند (۲۴). به منظور کاهش تجمع نانوذرات مگنتیت، سطح آنها در زمان تولید با لایهای از اولئیک اسید که دارای گروههای کربو کسیل (COOH-) بود و با ایجاد دافعه حاصل از بار سطحی منفی تجمع نانوذرات را کاهش میدهد، پوشانده شد (۲۵).



High resolution-scanning) HR-STEM تصویر شماره ۱: نمای (transmission electron microscopy نانوذرات مگنتیت) (خط شاخص = ۲۰ نانومتر)

الگوی تفرق اشعه X نانوذرات نیز در تصویر شماره ۲ ارایه شده است. پیکهای موجود در طیف ۲۰/۰، ۲۵/۵، ۴۳/۰ ۵۳/۵ و ۲/۵۹ درجه مطابق با پیکهای استاندارد مگنتیت (۴۹-۲۹) است (۲۶). بررسی خاصیت مغناطیسی نانوذرات مگنتیت توسط VSM نیز نشان میدهد که پسماند مغناطیسی



تصویر شماره ۲: الگوی تفرق اشعه X نانوذرات مگنتیت

آنها حدود صفر و دارای خاصیت سوپرپارامغناطیس می باشد. مغناطش اشباع نانوذرات سنتز شده بر اساس این تحلیل، مقدار قابل توجه ۰/۵ ± ۶۰ واحد الکترومغناطیس بر گرم اندازه گیری شد (تصویر شماره ۳). هر دوی این خصوصیات (یعنی داشتن خاصیت سوپرپارامغناطیسی و داشتن مقدار قابل توجه مغناطش اشباع) از مهم ترین ویژگی ها برای استفاده از نانوذرات مغناطیسی در زمینه های زیست آنالیز و جداسازی زیستی هستند.



در مرحله بعدی نانوذرات مگنتیت پوشیده شده با اولئیک اسید در تولوئن پخش شدند و پس از اضافه کردن به مخلوطی شامل آب دیونیزه، آمونیاک و اتانول به عنوان عامل امولسیون کننده، قطرههای امولسیونی تشکیل گردیدند. لایه سیلیکا بر اساس آبکافت و سپس چگالش TEOS اطراف هستههای متشکل از خوشه نانوذرات ایجاد شد. پیکهای تفرق اشعه X در

۲θ ~ ۲۰ درجه در تصویر شماره ۴، حضور لایه بی شکل سیلیکا اطراف هسته مغناطیسی با یک ساختار بلورین مشخص را تأیید میکند (۲۲).

در مرحله آخر پوسته خارجی متخلخل سیلیکا با استفاده از روش حذف الگوی سورفکتانت تشکیل شد. در این روش با استفاده از مولکولهای CTAB به عنوان الگوی ایجاد تخلخل و TEOS به عنوان منبع پیش ساز سیلیکا -که بر اساس نیروهای الکترواستاتیک با یکدیگر برهم کنش دارند- ساختاری متخلخل ایجاد می گردد. مولکولهای CTAB توسط کلسینه کردن خارج شد و حفرههای خالی از مولکولهای سورفکتانت در از ساختار نانوسامانه با استفاده از نتایج حاصل از تحلیل FTIR (تصویر شماره ۵) تأیید شد. پهنای جذبی در ۱۶۰۰-۱۹۰۷ و مربوط به مولکولهای CTAB است که پس از کلسینه کردن مربوط به مولکولهای CTAB است که پس از کلسینه کردن در طیف مربوط به نمونههای کلسینه شده به طور کامل از بین رفتهاند و مشاهده نمی شوند (۲۷).

نمای HR-STEM در تصویر شماره ۶ نشان دهنده ذرات نانو کامپوزیتی مغناطیسی با اندازه میانگین ۱۰ ± ۱۸۰ نانومتر با ساختاری سه لایه (هسته- پوسته- پوسته) شامل یک هسته از خوشه نانوذرات مگنتیت با قطر ۵ ± ۸۰ پوسته داخلی سیلیکا با ضخامت ۵ ± ۲۰ نانومتر و پوسته خارجی مزومتخلخل سیلیکا با ضخامت ۵ ± ۳۰ نانومتر است. نمودار توزیع اندازه نانوذرات نیز در تصویر شماره ۷ ارایه شده است.







تصویر شماره ۵: طیف FTIR) (Fourier transform infrared) از نانو کامپوزیت؛ ۵: قبل از کلسینه کردن، b: بعد از کلسینه کردن



تصویر شماره ۱: نمای High resolution-scanning transmission electron microscopy) HR-STEM) نانوسامانه با هسته نانوسامانه مگنتیت خوشهای پوشیده شده با لایه ناز ک سیلیکا و پوسته سیلیکای متخلخل



تصویر شماره ۷: نمودار توزیع اندازه نانوسامانه

يژوهشى

در الگوی تفرق اشعه X نانوسامانه در تصویر شماره ۸، پیک مربوط به سیلیکای غیر بلوری در ۲۵ ~ ۲۳ درجه مشاهده می شود. وجود پیک تفرق در زوایای کوچک در الگوی تفرق اشعه X زاویه کم نیز مشخصه ساختارهای مزومتخلخل است (۸۸). وجود پیک اول در ۲۵ ~ ۲/۲درجه و دو پیک دیگر در زوایای بزرگتر نشانگر ساختار هگزاگونال مزومتخلخل دوبعدی است (۲۹).

نمودار ایزوترم جذب نیتروژن برای نانوسامانه مغناطیسی متخلخل تولید شده بر اساس روش تحلیل BET در تصویر شماره ۹ آورده شده است. در این نمودار، در ناحیه اول ماده با یک لایه از مولکولهای گاز پوشانده شده است و منحنی جذب با شیب زیاد افزایش می یابد. در ناحیه دوم شیب کاهش پیدا می کند و به صفر نزدیک می شود. این امر به جذب چند لایه مولکولهای گاز نسبت داده شده است. این گونه تغییر منحنی جذب مربوط به ایزوترمهای جذب توسط مواد متخلخل است جذب مرابق با ایزوترم مای جذب توسط مواد متخلخل است حاضر مطابق با ایزوترم مای جذب توسامانه سنتز شده در تحقیق دارم. نمودار جذب واجذب نانوسامانه سنتز شده در تحقیق راد الای در مطابق با ایزوترم نوع چهارم دسته بندی (International Union of Pure and Applied Chemistry) برای نمودارهای هم دما است. مساحت سطح به دست آمده از

آنالیز BET برابر با ۳۹۰/۴ مترمربع بر گرم، قطر حفره در نمودار توزیع اندازه حفرهها ۳/۰۱۱ نانومتر و حجم داخلی آنها نیز ۰/۲۹۳۹ مترمکعب بر گرم به دست آمد. این ویژگیها، قابلیت لازم اولیه این ساختار برای به کارگیری در زمینه بارگذاری، حمل و رهش دارو را نشان می دهد.

اثر لایه سیلیکا بر خواص مغناطیسی نانوسامانه به وسیله آنالیز VSM بررسی شد. همان گونه که در تصویر شماره ۱۰ مشاهده می شود، مقدار مغناطش اشباع از ۶۰ واحد الکترومغناطیس بر گرم برای نانوذرات مگنتیت به ۲۰ ± ۲۱ واحد الکترومغناطیس بر گرم کاهش پیدا کرد که به دلیل پوشش هسته با دو لایه سیلیکای داخلی و لایه خارجی سیلیکای متخلخل است. با این نانو کامپوزیتهای و لایه خارجی سیلیکای متخلخل است. با این نانو کامپوزیتهای مشابهی که دارای هستهای متشکل از نانو ذرات مگنتیت و یا حتی خوشه نانوذرات مگنتیت با پوشش سیلیکا هستند، به دلیل وجود خوشهای از نانوذرات با تعداد بالای نانوذرات مگنتیت در هسته و با وجود دو لایه سیلیکا و بیشتر شدن ضخامت پوسته نانوسامانه افزایش قابل توجهی دارد. در تلوزرشی که با روشی مشابه با روش استفاده شده در مقاله حاضر نانوذرات مگنتیت را تولید کرد و با استفاده از سورفکتانت



[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-05-25





دیگری به عنوان الگو در تشکیل ساختار متخلخل، سطح نانوذرات مگنتیت را با سیلیکای متخلخل پوشش داده بودند، مقدار مغناطش اشباع نانوذرات مغناطیسی تولید شده با قطر ۲۸۷ نانومتر را ۴/۸۷ واحد الکترومغناطیس بر گرم گزارش کردند (۳۱) که بسیار کمتر از مغناطش اشباع ذرات تهیه شده در تحقیق حاضر می باشد (۳۲).

در تحقیق دیگری، مقدار مغناطش اشباع ناوذرات مغناطیسی با اندازه تقریبی ۱۲ نانومتر با هسته مگنتیت ۷ نانومتری و پوسته سیلیکای ۵ نانومتری مقداری حدود ۲۰ واحد الکترومغناطیس بر گرم گزارش شده است (۳۳). گروهی دیگر از محققین، نانوذرات مگنتیت را پس از تولید با استفاده از حلال غیر قطبی استون به صورت خوشهای در آوردند و با روش استوبر با لایهای از سیلیکا پوشش دادند. اندازه گزارش شده این نانوذره مغناطیسی کمتر از ۱۰۰ نانومتر به دست آمد و مقدار مغناطش اشباع آن ۱۰/۲ واحد الکترومغناطیس بر گرم گزارش شد (۱۳). سو پرپارامغناطیسی با پسماند مغناطیسی حدود صفر است. این دو ویژگی مطلوب از عوامل مهم برای استفاده از این نانوسامانه به

عنوان ماده حاجب در MRI است. سایر عوامل ضروری برای استفاده از این نانوسامانه به عنوان ماده حاجب در MRI نیز مورد بررسی مبسوط قرار گرفته است که نتایج آن در گزارش های بعدی ارایه خواهند شد.

بررسی نتایج سمیت سلولی

به منظور بررسی دقیق تر قابلیت کاربرد نانوسامانه تولید شده در این تحقیق در زمینه پزشکی، ارزیابی سمیت سلولی نانوسامانه سنتز شده ضروری است. به این منظور، از دو دودمان سلولی چسبنده سرطان پروستات ۹۵۵–۵u و سلول شناور سرطان خون K۵۶۲ استفاده شد. آزمون استاندارد MTT که بر اساس توانایی سلول های زنده در تبدیل محلول بروماید تترازولیوم بلو تیازولیل سلول های زنده در تبدیل محلول بروماید ترازولیوم بلو تیازولیل میکرو گرم بر میلی نامحلول فورمازان آبی رنگ در میتو کندری میکرو گرم بر میلی لیتر) اجرا شد (۳۴). نمودارهای به دست آمده برای هر دو سلول تیمار شده با غلظتهای مختلف نانوسامانه به برای هر دو نوع سلول مشاهده می شود که قابلیت زنده ماندن



تصویر شماره ۱۰: نمودار مغناطش ذرات مغناطیسی سه لایه خوشه نانوذرات مگنتیت در سیلیکای مزومتخلخل



تصویر شماره ۱۱: نمودار MTT (Afs-dimethylthialzol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). برای سلول های LD-120 بعد از ۲۶ ساعت تیمار با غلظت های مختلف از نانوسامانه تولید شده





يژوهشى

سلولها در مجاورت نانوسامانه حتی در غلظتهای به نسبت بـالا نیز نسبت به آن در عدم حضور نانوسامانه، کاهش نمییابد.

سنجش LDH نیز برای ارزیابی سلامت غشای سلولی به کار می رود؛ چرا که آزاد شدن آنزیم LDH از محیط سیتوپلاسمی و رها شدن آن در محیط خارج سلولی نشان دهنده تخریب غشای سلولی و مرگ آن می باشد و نتیجه آن، افزایش غلظت این آنزیم در محیط اطراف سلول خواهد بود. تصاویر شماره ۱۳ و ۱۴ نتایج مربوط به این سنجش را برای دو دودمان سلولی ۱۴۵ – DU و ۲۵۹۲ تیمار شده با غلظتهای مختلف نانوذره نشان می دهد. بعد از تیمار کردن سلولها با

نانوسامانه به مدت ۲۴ ساعت و نمونه گیری از سرم رویی سلولها، سطح LDH سلولهای تیمار شده با نانوسامانه در حضور غلظتهای ۱ تا ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوسامانه حتی نسبت به سطح LDH سلولهای کنترل نیز کاهش قابل توجهی داشت و تنها در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر نانوسامانه افزایش بسیار ناچیزی در مقایسه با سلولهای کنترل مشاهده شد. نتایج به دست آمده از دو سنجش فوق نشان می دهد که نانوسامانه ساخته شده دارای خاصیت زیست ساز گاری قابل توجهی بوده است و اثر سمیتی بر سلولهای مورد آزمایش در این تحقیق نداشته است.



تصویر شماره ۱۳: نمودار Lactate dehydrogenase) LDH بعد از ۲۵ ما DU-۱۶۵ بعد از ۲۶ ساعت تیمار با غلظتهای مختلف از نانوسامانه تولید شده



تصویر شماره ۱٤: نمودار LDtatate dehydrogenase) برای سلولهای K۵٦۲ بعد از ۲۶ ساعت تیمار با غلظتهای مختلف از نانوسامانه تولید شده

بحث

مطالعه در زمینه اثر سمیت سلولی نانوذرات از جنس سیلیکا بر روی سلول های متفاوت دیگر توسط پژوهشگران انجام شده است. در همه تحقیقات عدم سمیت سلولی این نانوذرات در محدوده غلظت بررسی شده و در نتیجه مناسب بودن این نانومواد برای کاربردهای زیستی و یز شکی تأیید شده است. به عنوان مثال، در تحقیقی سمیت سلولی نانو ذرات سیلیکای متخلخل با اندازه تقریبی ۲۰۰ نانومتر بر روی سلول های ۲-Caco بررسی شد و نتایج آن نشان داد که نانو ذرات فوق دارای اثر سمیت سلولی ناچیزی بر سلول های مربوطه بودهاند (۳۵). در تحقيق ديگري، سميت سلولي نانو کامپوزیت هسته- پوسته با اندازه تقریبی ۸۶ نانومتر شامل هسته مغناطیسی نانو ذرات مگنتیت خو شهای شده تو سط محلول استون- هگزان يو شيده شده با لايه سيليكاي غير متخلخل در غلظت های مختلف از نانو کامیوزیت بر سلول های MG U-۲۵۱ glioma بررسی شد و نتایج آن نشان داد که حتبی در غلظتهای بالا تا ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر از این نانو کامیوزیت نیز سميت سلولي قابل توجهي ايجاد نمي شود (٣١).

پیژوهش دیگری نیز عدم سمیت سلولی نانو کامپوزیت هسته- پوسته با اندازه ۹۷ نانومتر شامل هسته نانوذرات مگنتیت و پوسته سیلیکای متخلخل و مولکول های پلی اتیلن گلیکول MCF-۷ ، سلول های سرطان سینه ۷-MCF تما غلظت ۳۵۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از نانو کامپوزیت را گزارش کردهاند (۳۶)، اما تا به حال گزارشی مبنی بر ساخت نانوسامانهای با این ساختار برای کاربردهای چندگانه پزشکی (تشخیص و درمان) مبتنی بر هسته خوشهای از نانوذرات مگنتیت و دو لایه سیلیکای غیر متخلخل و متخلخل و بررسی خصوصیات سمیت سلولی آن ها در منابع ارایه نشده است؛

and targeted systems for cancer therapy. Adv Drug Deliv Rev 2004; 56(11): 1649-59.

4. Kawasaki ES, Player A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. Nanomedicine 2005; 1(2): 101-9.

بنابراین امکان مقایسه خصوصیات سمیت سلولی سامانه تهیه شده در تحقیق حاضر با ساختارهای مشابه گزارش شده در تحقیقات دیگر وجود ندارد.

در تحقیق حاضر نانو سامانهای ذرهای شکل متشکل از یک هسته مغناطیسی و دو لایه از جنس سیلیکا (یک لایه داخلی غير متخلخل و يک لايه خارجي متخلخل) با اندازه ميانگين ۱۸۰ نانومتر تهیه شد. هسته این نانوسامانه شامل خوشهای از نانوذرات مگنتیت با اندازه ۸۰ نانومتر بود. به منظور جلو گیری از اکسایش، این هسته با لایه ناز کی از سیلیکای غیر متخلخل با ضخامت ۲۰ نانومتر يوشانده شد. يوسته خارجي نيز كه متشكل از لايه اي از سيليكاي متخلخل با ضخامت ۳۰ نانومتر، مساحت سطحي بالا و توزيع باريك اندازه حفرهها بود، با روش حذف الگو و استفاده از مولکولهای CTAB به عنوان سورفکتانت تشکیل شد. نتایج نشان دادند که مغناطش اشباع نانوسامانه به دليل وجود خوشه نانوذرات مگنتيت در هسته بـالا مـي باشـد و نانوسامانه به دست آمده دارای خاصیت سویریارامغناطیسی است. ویژگی مذکور، این نانوسامانه را به عنوان یک ماده حاجب برای MRI مناسب می سازد. از طرفی آزمایش های بررسی سمیت سلولی نانوسامانه به دست آمده بر دو نوع دودمان سلولي متفاوت نشان دادند كه اين نانوسامانه داراي سمیت سلولی در محدوده غلظت به کار گرفته شده برای ذرات نبوده است و با توجه به ویژگی های سطحی مناسب مي تواند به عنوان حامل انتقال دارو به كار رود. با توجه به اندازه به دست آمده (کمتر از ۲۰۰ نانومتر) و ویژگیهای قابل توجه دیگر، این نانوسامانه دارای قابلیت های لازم اولیه برای استفاده همزمان در MRI و همچنین به عنوان یک سامانه برای حمل و انتقال دارو است. بررسی بیشتر این مسأله، موضوع تحقيقات بعدي اين گروه است.

References

- 1. Gupta AS. Nanomedicine approaches in vascular disease: a review. Nanomedicine 2011; 7(6): 763-79.
- 2. Drexler KE, Peterson C, Pergamit G. Unbounding the future: the nanotechnology revolution. New York, NY: Morrow; 1991.
- 3. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle



- Shi Y. Superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging (MRI) diagnosis [Thesis]. Adelaide SA: School of Chemical Engineering, The University of Adelaide; 2006.
- Jain TK, Richey J, Strand M, Leslie-Pelecky DL, Flask CA, Labhasetwar V. Magnetic nanoparticles with dual functional properties: drug delivery and magnetic resonance imaging. Biomaterials 2008; 29(29): 4012-21.
- Varadan VK, Chen LF, Xie J. Nanomedicine: Design and Applications of Magnetic Nanomaterials, Nanosensors and Nanosystems. New Jersey, NJ: John Wiley & Sons; 2008.
- Thorek DL, Chen AK, Czupryna J, Tsourkas A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. Ann Biomed Eng 2006; 34(1): 23-38.
- Yan A, Liu X, Qiu G, Wu H, Yi R, Zhang N, et al. Solvothermal synthesis and characterization of size-controlled Fe3O4 nanoparticles. Journal of Alloys and Compounds 2008; 458(1-2): 487-91.
- 10. Woo E, Ponvel KM, Ahn IS, Lee CH. Synthesis of magnetic/silica nanoparticles with a core of magnetic clusters and their application for the immobilization of His-tagged enzymes. J Mater Chem 2010; 20: 1511-5.
- 11. Stöber W, Fink A. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. Journal of Colloid and Interface Science 1968; 26(1): 62-9.
- Orive G, Hernandez RM, Rodriguez GA, Dominguez-Gil A, Pedraz JL. Drug delivery in biotechnology: present and future. Curr Opin Biotechnol 2003; 14(6): 659-64.
- 13. Emerich DF, Thanos CG. Targeted nanoparticlebased drug delivery and diagnosis. J Drug Target 2007; 15(3): 163-83.
- Groneberg DA, Giersig M, Welte T, Pison U. Nanoparticle-based diagnosis and therapy. Curr Drug Targets 2006; 7(6): 643-8.
- 15. Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu CW, Lin VS. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. Adv Drug Deliv Rev 2008; 60(11): 1278-88.
- 16. Zhao Y, Trewyn BG, Slowing II, Lin VS. Mesoporous silica nanoparticle-based double drug delivery system for glucose-responsive controlled release of insulin and cyclic AMP. J Am Chem Soc 2009; 131(24): 8398-400.
- 17. Souza KC, Mohallem ND, Sousa EM. Mesoporous silica-magnetite nanocomposite: facile synthesis route for application in hyperthermia. Journal of Sol-Gel Science and Technology 2010; 53(2): 418-27.
- Sevilla M, Valdes-Solis T, Tartaj P, Fuertes AB. Fabrication of mesoporous SiO(2)-C-Fe(3)O(4)/gamma-Fe(2)O(3) and SiO(2)-C-Fe magnetic composites. J Colloid Interface Sci

2009; 340(2): 230-6.

- 19. Silva RN, Asquieri ER, Fernandes KF. Immobilization of Aspergillus niger glucoamylase onto a polyaniline polymer. Process Biochemistry 2005; 40(3-4): 1155-9.
- 20. Prakash A, Zhu H, Jones CJ, Benoit DN, Ellsworth AZ, Bryant EL, et al. Bilayers as phase transfer agents for nanocrystals prepared in nonpolar solvents. ACS Nano 2009; 3(8): 2139-46.
- 21. Zhao SY, Lee DK, Kim CW, Cha HG, Kim YH, Kang YS. Synthesis of magnetic nanoparticles of Fe3O4 and CoFe2O4 and their surface modification by surfactant adsorption. Bulletin of the Korean Chemical Society 2006; 27(2): 237-42.
- 22. Hu C, Gao Z, Yang X. Fabrication and magnetic properties of Fe3O4 octahedra. Chemical Physics Letters 2006; 429(4-6): 513-7.
- 23. Hartley PA, Parfitt GD, Pollack LB. The role of the van der Waals force in the agglomeration of powders containing submicron particles. Powder Technology 1985; 42(1): 35-46.
- 24. Lalatonne Y, Richardi J, Pileni MP. Van der Waals versus dipolar forces controlling mesoscopic organizations of magnetic nanocrystals. Nat Mater 2004; 3(2): 121-5.
- 25. Xu XQ, Shen H, Xu JR, Xie MQ, Li XJ. The colloidal stability and core-shell structure of magnetite nanoparticles coated with alginate. Applied Surface Science 2006; 253(4): 2158-64.
- 26. Banerjee SS, Chen DH. Magnetic Nanoparticles Grafted with Cyclodextrin for Hydrophobic Drug Delivery. Chem Mater 2007; 19(25): 6345-9.
- 27. Li YS, Church JS, Woodhead AL, Moussa F. Preparation and characterization of silica coated iron oxide magnetic nano-particles. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2010; 76(5): 484-9.
- 28. Sen T, Bruce IJ. Mesoporous silica-magnetite nanocomposites: Fabrication, characterisation and applications in biosciences. Microporous and Mesoporous Materials 2009; 120(3): 246-51.
- 29. Wang Y, Ren J, Liu X, Wang Y, Guo Y, Guo Y, et al. Facile synthesis of ordered magnetic mesoporous gamma-Fe2O3/SiO2 nanocomposites with diverse mesostructures. J Colloid Interface Sci 2008; 326(1): 158-65.
- Naumov S. Hysteresis Phenomena in Mesoporous Materials [Thesis]. Leipzig, Germany: University of Leipzig; 2009.
- Wan J, Meng X, Liu E, Chen K. Incorporation of magnetite nanoparticle clusters in fluorescent silica nanoparticles for high-performance brain tumor delineation. Nanotechnology 2010; 21(23): 235104.
- 32. Wang F, Guo C, Yang LR, Liu CZ. Magnetic mesoporous silica nanoparticles: fabrication and their laccase immobilization performance. Bioresour Technol 2010; 101(23): 8931-5.
- 33. Lee J, Lee Y, Youn JK, Na HB, Yu T, Kim H, et al. Simple synthesis of functionalized

superparamagnetic magnetite/silica core/shell nanoparticles and their application as magnetically separable high-performance biocatalysts. Small 2008; 4(1): 143-52.

- 34. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65(1-2): 55-63.
- 35. Patil A, Chirmade UN, Trivedi V, Lamprou DA, Urquart A, Douroumis D. Encapsulation of water

insoluble drugs in mesoporous silica nanoparticles using supercritical carbon dioxide. J Nanomedic Nanotechnol 2011; 2(3): 111.

36. Kim J, Kim HS, Lee N, Kim T, Kim H, Yu T, et al. Multifunctional uniform nanoparticles composed of a magnetite nanocrystal core and a mesoporous silica shell for magnetic resonance and fluorescence imaging and for drug delivery. Angew Chem Int Ed Engl 2008; 47(44): 8438-41.