ORIGINAL ARTICLE

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

Foroogh Toubi[1],
Ayyoob Arpanaei[2],
Abdolkhalegh Deezaji[3],
Mohammad Ali Oghabian[4],
Seyed Safa-Ali Fatemi[2]

[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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۲ اردیبهشت سال ۱۳۹۳ (۲۲-۹)

ساخت و تعیین ویژگی ذرات نانوکامپوزیتی متخلخل سیلیکای مغناطیسی برای کاربردهای پزشکی و بررسی سمیت سلولی آن‌ها

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

چکیده

سابقه و هدف: تشخیص به موقع و درمان مؤثر بیماری‌های صعب‌العلاج از چالش‌های بسیار مهم در زمینه نانوپزشکی است. هدف از این تحقیق، سنتز و تعیین ویژگی‌های ذرات نانوکامپوزیتی سه لایه سیلیکای مغناطیسی با قابلیت به کارگیری هم‌زمان به عنوان عامل حاجب در تصویربرداری تشدید مغناطیسی (Magnetic resonance imaging یا MRI) 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 مولکول‌های سورفکتانت توسط آنالیز مادون قرمز تبدیل فوریه (Fourier transform infrared یا FTIR)، بررسی اندازه و مورفولوژی ذرات توسط تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری-روبشی با قدرت تفکیک بالا (High resolution-scanning transmission electron microscopy یا HR-STEM)، خصوصیات مغناطیسی ذرات توسط دستگاه مغناطیس‌سنج نمونه ارتعاشی (Vibrating sample manetometer یا VSM)، ساختار متخلخل با استفاده از روش Brunauer-Emmett-Teller و ساختار بلوری نانوسامانه نیز با آنالیز تفرق اشعه ایکس (XRD یا X-Ray diffraction) بررسی شد. سنجش‌های MTT (3-[4,5-dimethylthialzol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) و LDH (Lactate dehydrogenase) برای بررسی سمیت سلولی ذرات سنتز شده استفاده گردید.

یافته‌ها: نانوسامانه سه لایه سنتز شده دارای اندازه ۱۰ ± ۱۸۰ نانومتر و مساحت ویژه و قطر متوسط حفره ذرات به ترتیب ۳۹۰/٤ مترمربع بر گرم و ۳/۰۱ نانومتر بود. مغناطش اشباع نانوسامانه برابر با ۰/۵ ± ۲۱ واحد الکترومغناطیس بر گرم به دست آمد. بررسی سمیت سلولی نانوسامانه بر دو دودمان سلولی سرطان پروستات اپی‌تلیال چسبنده DU-١٤٥ و سرطان خون اریترولوکمیک شناور K٥٦٢ انجام شد. نتایج بررسی سمیت سلولی نشان داد که نانوسامانه به دست آمده در غلظت‌های آزمایش شده، سمیت سلولی ایجاد نکردند.

استنتاج: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نانوسامانه سنتز شده دارای قابلیت‌های لازم اولیه برای به کارگیری هم‌زمان به عنوان 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 نانوفن‌آوری در حوزه پزشکی (نانوپزشکی) دستخوش تغییرات قابل توجهی می‌شود (۱). نانوپزشکی در واقع کاربرد نانوفن‌آوری در نمایش، تشخیص،

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، بابل، تهران
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
۴. دانشیار، گروه آنالیز تصاویر بیومولکولی، مرکز تحقیقات تصویربرداری سلولی- مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۱۲/۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱/۳۱

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

پیشگیری و درمان بیماری‌ها و بافت‌های بیمار در سامانه‌های زیستی است (۲). در دو دهه اخیر تحقیقات زیادی در زمینه توسعه ابزار کارامد جهت تشخیص و درمان بر پایه نانوذرات در مورد سرطان، دیابت و بسیاری از بیماری‌های دیگر انجام شده است (۴، ۳). تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI یا Magnetic resonance imaging) یکی از ابزارهای قدرتمند در زمینه تشخیص می‌باشد. این تکنیک بر پایه رزونانس مغناطیسی هسته همراه با عامل حاجب مناسب، می‌تواند امکان تشخیص زودهنگام سرطان و تصویربرداری در سطوح مولکولی را فراهم کند (۵).

عوامل حاجب رایج در MRI دارای معایبی از جمله سمیت، زمان کوتاه گردش در خون، حساسیت ردیابی پایین و عدم قابلیت عملکرد چندگانه هستند (۶). نانوذرات اکسید آهن از جمله مگنتیت (Fe_3O_4) با ساختار کوچک و دارا بودن خاصیت سوپرپارامغناطیسی، سمیت پایین، نیمه عمر بالا و خاصیت حاجبی بسیار خوب به عنوان تقویت کننده، کیفیت تصاویر MRI را بهبود می‌بخشند (۸، ۷). نانوذرات مگنتیت با روش‌های متنوعی از جمله هم‌رسوبی، رسوبی- کاهشی، هیدروترمال، سل- ژل و... ساخته می‌شوند (۹). نانوذرات مگنتیت با توزیع اندازه باریک و محدوده اندازه ذرات حدود ۱۰ نانومتر را می‌توان با استفاده از روش هم‌رسوبی شیمیایی تولید کرد و با خوشه‌ای کردن نانوذرات مگنتیت تولید شده، مغناطیس‌پذیری آن‌ها را افزایش داد (۱۰). نانوخوشه‌های مگنتیت تولید شده می‌توانند با استفاده از روش تصحیح شده استوبر (Stober) به عنوان هسته‌هایی برای تراکم تترااتیل اورتوسیلیکات (Tetraethyl orthosilicate یا TEOS) (ماده پیش‌ساز سیلیکا) هیدرولیز شده عمل کنند و لایه‌ای از سیلیکا برای محافظت از هسته مغناطیسی و افزایش زیست سازگاری آن ایجاد کنند (۱۱).

از طرف دیگر، توسعه روش‌های 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 نانوفن‌آوری به سبب تغییر فارموکنتیک دارو، افزایش نیمه عمر چرخه سامانه‌ای دارو با کاهش مصونیت‌زایی، آزادسازی داروها با سرعت ثابت، کاهش اثرات جانبی با انتقال دارو به ناحیه هدف، انتقال دو یا چند دارو به منظور تلفیق درمان با ایجاد اثر هم‌زمان و یا از بین بردن مقاومت دارویی به طور هم‌زمان و کاهش سمیت دارو بهبود چشمگیری داشته‌اند (۱۴، ۱۳). در این میان با توجه به خواص منحصر به فرد سیلیکای متخلخل از جمله زیست سازگاری، مساحت بالا و حجم حفره‌های بزرگ، تنظیم‌پذیر بودن اندازه حفره‌ها، قابلیت بارگذاری قابل توجه مولکول‌های دارویی، انعطاف‌پذیری در برابر اتصال گروه‌های شیمیایی مختلف بر روی سطح به منظور انتقال هدفمند دارو و پایداری شیمیایی، استفاده از ذرات یا لایه‌های سنتز شده از سیلیکای متخلخل به عنوان حامل‌های دارویی، این ماده می‌تواند بسیار سودمند باشد (۱۵).

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

در برخی گزارش‌ها 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 می‌توانند دارای کاربردهای مختلفی باشند (۱۸، ۱۷). در این تحقیق نانوسامانه‌هایی با هسته- خوشه نانوذرات مگنتیت، پوسته داخلی سیلیکا و پوسته خارجی سیلیکای مزومتخلخل سنتز شدند و ویژگی‌های آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. هسته مغناطیسی تقویت شده در این نانوسامانه‌ها باعث بهبود قابلیت آن‌ها به منظور افزایش میزان روشنایی در تصویربرداری تشدید مغناطیسی و لایه خارجی مزومتخلخل سیلیکا ساختار مناسبی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

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

مواد و روش‌ها

مواد

برای تولید نانوسامانه با هسته- خوشه نانوذرات مگنتیت و پوسته خارجی سیلیکای متخلخل، کلرید آهن ۲ و ۳ ظرفیتی و به ترتیب ۴ و ۶ آبه، محلول آمونیاک (۳۰-۲۸ دصد)، اولئیک اسید (۹۰ درصد)، تولوئن (۹۹/۹ درصد)، اتانول (۹۹/۹ درصد)، تترااتیل اورتوسیلیکات، ستیل تری‌متیل آمونیوم بروماید (CTAB یا Cetyl trimethyl ammonium bromide) و دی‌متیل سولفوکساید (Dimethylsulfoxide یا DMSO) از شرکت آلمانی Merck خریداری شد. به منظور کشت سلولی نیز محیط‌های کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)، RPMI (Roswell Park Memorial Institute)، سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum یا FBS) و ترکیب پنی‌سیلین/استرپتومایسین از شرکت Gibco آمریکا تهیه شدند. ترکیب MTT (3-[4,5-dimethylthialzol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) از شرکت Sigma آمریکا و کیت تشخیصی LDH (Lactate dehydrogenase) نیز از شرکت زیست شیمی ایران خریداری شد. دودمان سلولی K۵۶۲ و سلول‌های DU-۱۴۵ از بانک سلولی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری تهیه گردید. در همه آزمایش‌ها آب دیونیزه مورد استفاده قرار گرفت.

سنتز نانوذرات مگنتیت

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 ۰/۱ میلی‌لیتر اولئیک اسید اضافه شد و واکنش هم‌رسوبی شیمیایی با افزودن ۷/۵ میلی‌لیتر محلول آمونیاک صورت گرفت. مخلوط حاصل تا دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و سپس مقدار ۰/۴ میلی‌لیتر 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. نانوذرات مگنتیت پوشیده شده با اولئیک اسید توسط آهن‌ربای مغناطیسی جدا گردید و سه بار با آب دیونیزه شستشو داده شد.

سنتز ذرات با ساختار هسته- پوسته خوشه نانوذرات مگنتیت پوشیده شده با سیلیکا

نانوذرات مگنتیت پوشیده شده با اولئیک اسید با استفاده از یک روش اصلاح شده (۱۰)، به صورت خوشه‌ای درآمد و به طور هم‌زمان با لایه‌ای از سیلیکا پوشانده شد. در این روش، در ابتدا مقدار ۷۵ میلی‌گرم از نانوذرات مگنتیت پخش شده در ۵ میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر TEOS آرام آرام در مدت ۳۰ دقیقه به محلول فوق اضافه گردید و هم زدن به مدت ۴ ساعت ادامه پیدا کرد. سپس محصول توسط آهن‌ربای مغناطیسی جمع‌آوری و ابتدا سه بار با اتانول و سپس سه بار با آب دیونیزه شستشو داده شد.

ایجاد پوشش سیلیکای متخلخل بر روی ذرات با ساختار 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 محلولی از آب دیونیزه، اتانول و محلول آمونیاک به

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

نسبت حجمی ۵۵:۳۰:۴۰/۰ پخش شد. سپس ۳۰ میلی‌گرم 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، ۰/۲۱ میلی‌لیتر 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 سانتی‌گراد خشک شد. به منظور حذف CTAB و ایجاد ساختار متخلخل، نمونه سنتز شده در کوره با دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد 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 تصاویر HR-STEM (High resolution-scanning transmission electron microscopy) به دست آمده از میکروسکوپ Philips CM۲۰۰-FEG بررسی شد. اندازه ذرات و ضخامت لایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار آنالیز تصویر از تصاویر متعدد و بر اساس اندازه‌گیری حداقل ۱۰۰ نانوذره محاسبه گردید. به منظور بررسی ساختار شیمیایی ذرات سنتز شده، آنالیز تفرق اشعه ایکس (X-Ray diffraction یا XRD) با استفاده از دستگاه Brucker D۸ انجام شد. حذف مولکول‌های CTAB بعد از کلسینه کردن با استفاده از آنالیز FTIR (Fourier transform infrared) مورد بررسی قرار گرفت. مشخصات تخلخل سطح نانوسامانه با استفاده از روش BET (Brunauer–Emmett–Teller) و BJH (Barrett-Joyner-Halenda) از نمودارهای جذب ایزوترم آنالیزگر Belsorp miniII تعیین گردید. خواص مغناطیسی نیز با استفاده از دستگاه VSM (Vibrating sample magnetometer) بررسی شدند.

کشت سلول

سلول‌های اپی‌تلیال چسبنده سرطان پروستات DU-۱۴۵ در محیط کشت DMEM و سلول‌های اریترولوکمیک شناور سرطان خون K۵۶۲ در محیط کشت RPMI۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد FBS (که به ترتیب حاوی ۱۲۰ و ۲۲۰ میلی‌گرم در لیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین بودند)، کشت داده شدند و در انکوباتور با شرایط ۵ درصد دی‌اکسید کربن، ۹۵ درصد رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هفته‌ای یک بار واکشت سلولی انجام و از تریپان بلو (تریپان آبی) برای شمارش سلول‌های زنده استفاده شد.

مطالعات سمیت سلولی

سنجش MTT یک روش رنگ‌سنجی استاندارد و نشان دهنده میزان قابلیت زنده ماندن سلول‌ها از طریق اندازه‌گیری 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 ۲×۱۰^{۴} 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، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر 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 میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT به هر یک از حفره‌ها اضافه و به مدت ۴ ساعت دیگر در انکوباتور قرار داده شدند. سپس محلول رویی با سانتریفوژ کردن خارج و مقدار ۱۰۰ میکروگرم 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 اندازه‌گیری فعالیت آنزیم LDH در یک کشت، میزان مرگ و میر سلولی را نشان می‌دهد. آسیب دیدن سلول‌ها باعث افزایش مقدار LDH در سرم و یا محیط سلولی می‌شود.

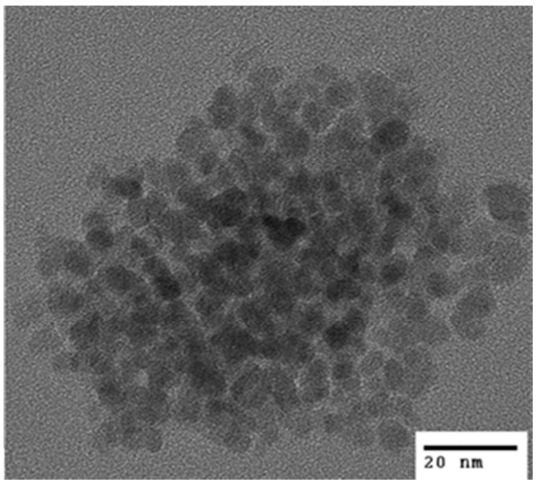
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

دستورالعمل استفاده از کیت‌ها توسط شرکت‌های سازنده آن‌ها ارایه شده است. واکنش اکسایش- کاهش معرف‌های کیت توسط LDH آزاد شده کاتالیز گردید؛ بنابراین سرعت واکنش با فعالیت LDH در محیط سلول نسبت مستقیم دارد. بعد از قرار گرفتن سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های مختلف از نانوسامانه به مدت ۲۴ ساعت مطابق با شرایط به کار برده شده برای تحلیل MTT، مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از سرم روی سلول‌ها برداشته شد و بر اساس دستورالعمل کیت، مورد بررسی قرار گرفت. مقدار جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه UV-Vis Spectrometer اندازه‌گیری و محاسبات مربوطه برای محاسبه نسبت تعداد سلول‌های مرده به تعداد کل سلول‌ها انجام شد.

یافته‌ها

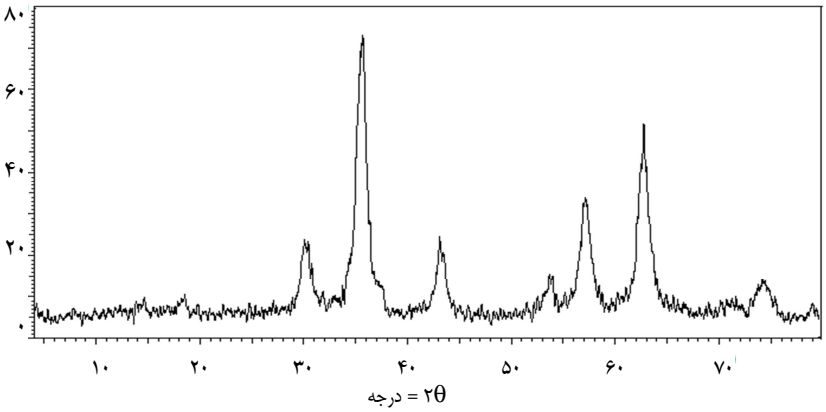
تعیین ویژگی‌های ذرات نانوکامپوزیتی سنتز شده

تصویر شماره ۱، نمای HR-STEM نانوذرات مگنتیت کروی شکل منفرد تولید شده با اندازه میانگین ۰/۹ ± ۷/۵ 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 برهم‌کنش‌های 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 کربوکسیل (COOH-) بود و با ایجاد دافعه حاصل از بار سطحی منفی تجمع نانوذرات را کاهش می‌دهد، پوشانده شد (۲۵).



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

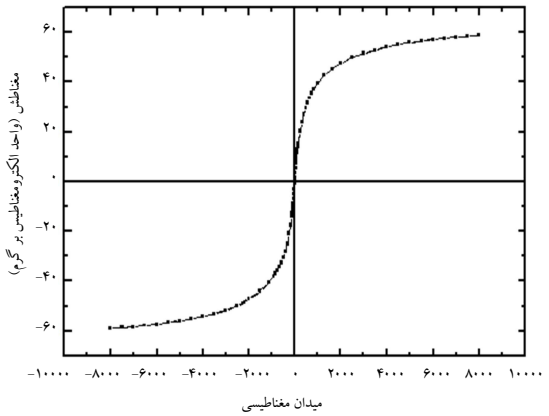
الگوی تفرق اشعه X نانوذرات نیز در تصویر شماره ۲ ارایه شده است. پیک‌های موجود در طیف ۳۰/۰، ۳۵/۵، ۴۳/۰، ۵۳/۵، ۵۷/۰ و ۶۲/۵ درجه مطابق با پیک‌های استاندارد مگنتیت (Fe_3O_4) است (۲۶). بررسی خاصیت مغناطیسی نانوذرات مگنتیت توسط VSM نیز نشان می‌دهد که پسماند مغناطیسی



تصویر شماره ۲: الگوی تفرق اشعه X نانوذرات مگنتیت

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

آن‌ها حدود صفر و دارای خاصیت سوپرپارامغناطیس می‌باشد. مغناطش اشباع نانوذرات سنتز شده بر اساس این تحلیل، مقدار قابل توجه ۰/۵ ± ۶۰ واحد الکترومغناطیس بر گرم اندازه‌گیری شد (تصویر شماره ۳). هر دوی این خصوصیات (یعنی داشتن خاصیت سوپرپارامغناطیسی و داشتن مقدار قابل توجه مغناطش اشباع) از مهم‌ترین ویژگی‌ها برای استفاده از نانوذرات مغناطیسی در زمینه‌های زیست آنالیز و جداسازی زیستی هستند.

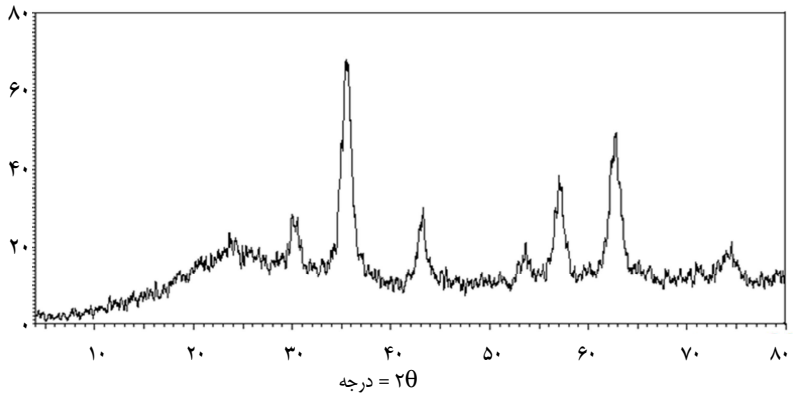


تصویر شماره ۳: نمودار مغناطش نانوذرات مگنتیت

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 بی‌شکل سیلیکا اطراف هسته مغناطیسی با یک ساختار بلورین مشخص را تأیید می‌کند (۲۲).

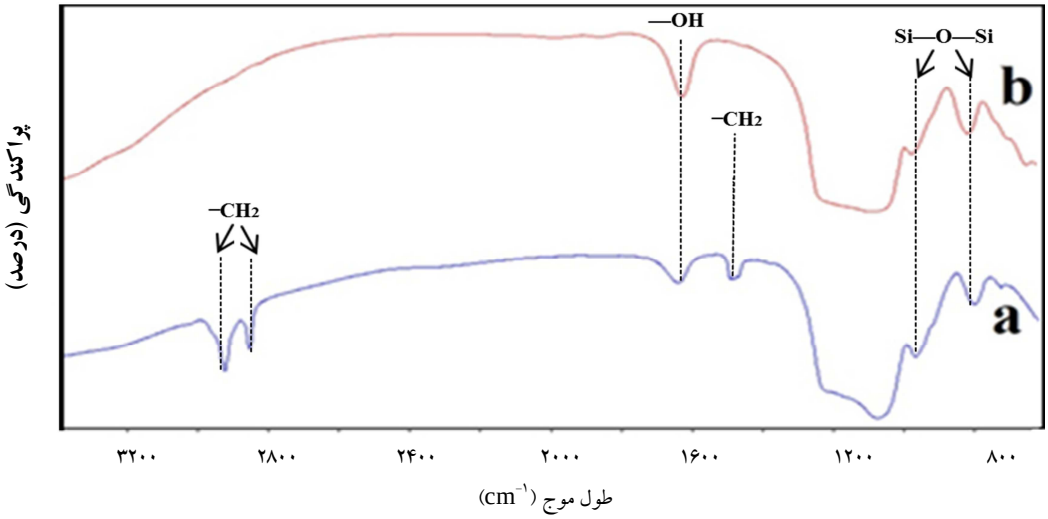
در مرحله آخر پوسته خارجی متخلخل سیلیکا با استفاده از روش حذف الگوی سورفکتانت تشکیل شد. در این روش با استفاده از مولکول‌های CTAB به عنوان الگوی ایجاد تخلخل و TEOS به عنوان منبع پیش‌ساز سیلیکا -که بر اساس نیروهای الکترواستاتیک با یکدیگر برهم‌کنش دارند- ساختاری متخلخل ایجاد می‌گردد. مولکول‌های CTAB توسط کلسینه کردن خارج شد و حفره‌های خالی از مولکول‌های سورفکتانت در درون لایه سیلیکای خارجی ایجاد گردید. حذف این مولکول‌ها از ساختار نانوسامانه با استفاده از نتایج حاصل از تحلیل FTIR (تصویر شماره ۵) تأیید شد. پهنای جذبی در ۱۶۰۰-۱۴۰۰ و ۳۰۰۰-۲۸۰۰ واحد بر سانتی‌متر که مشخصه پیوند $-CH_2$ هستند، 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 نمی‌شوند (۲۷).

نمای HR-STEM در تصویر شماره ۶ نشان دهنده ذرات نانوکامپوزیتی 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.

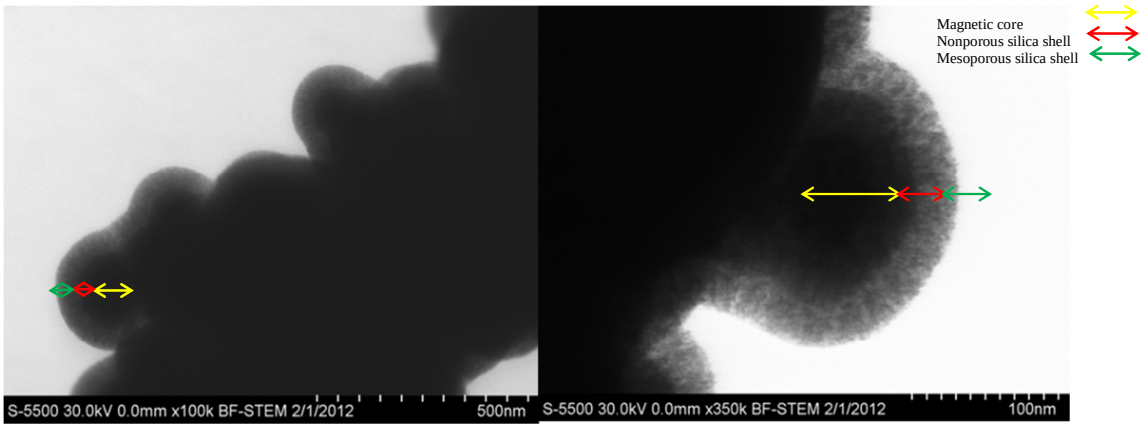


تصویر شماره ٤: الگوی تفرق اشعه X ذرات نانوکامپوزیتی با ساختار هسته- پوسته خوشه نانوذرات مگنتیت در سیلیکا

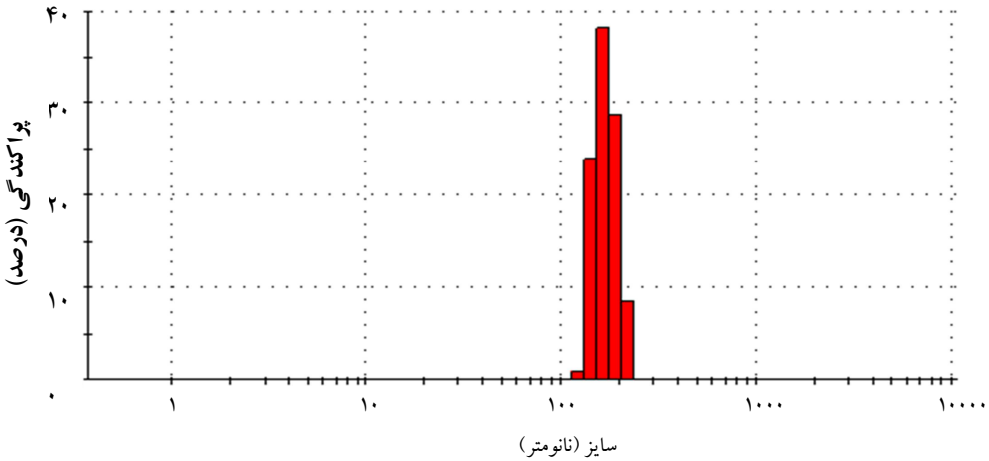
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]



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



تصویر شماره ٦: نمای HR-STEM (High resolution-scanning transmission electron microscopy) نانوسامانه با هسته نانوسامانه مگنتیت خوشه‌ای پوشیده شده با لایه نازک سیلیکا و پوسته سیلیکای متخلخل



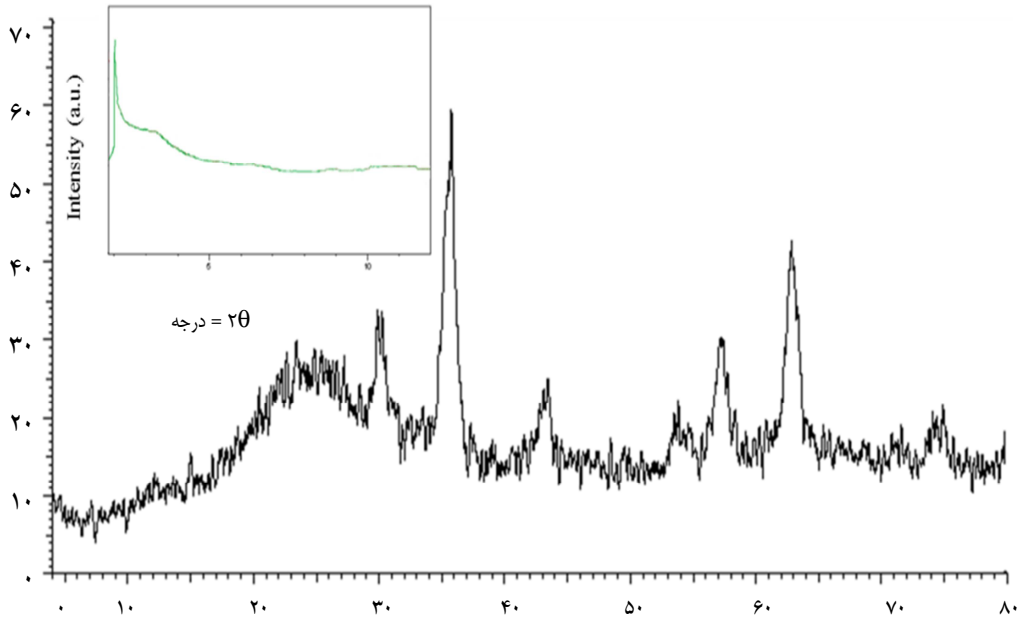
تصویر شماره ۷: نمودار توزیع اندازه نانوسامانه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

در الگوی تفرق اشعه X نانوسامانه در تصویر شماره ۸، پیک مربوط به سیلیکای غیر بلوری در ۲θ ~ ۲۳ درجه مشاهده می‌شود. وجود پیک تفرق در زوایای کوچک در الگوی تفرق اشعه X زاویه کم نیز مشخصه ساختارهای مزومتخلخل است (۲۸). وجود پیک اول در ۲θ ~ ۲/۲درجه و دو پیک دیگر در زوایای بزرگ‌تر نشانگر ساختار هگزاگونال مزومتخلخل دوبعدی است (۲۹).

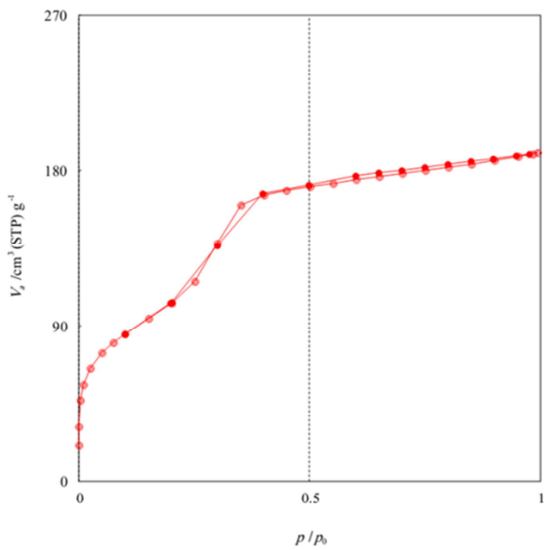
نمودار ایزوترم جذب نیتروژن برای نانوسامانه مغناطیسی متخلخل تولید شده بر اساس روش تحلیل BET در تصویر شماره ۹ آورده شده است. در این نمودار، در ناحیه اول ماده با یک لایه از مولکول‌های گاز پوشانده شده است و منحنی جذب با شیب زیاد افزایش می‌یابد. در ناحیه دوم شیب کاهش پیدا می‌کند و به صفر نزدیک می‌شود. این امر به جذب چند لایه مولکول‌های گاز نسبت داده شده است. این گونه تغییر منحنی جذب مربوط به ایزوترم‌های جذب توسط مواد متخلخل است (۳۰). نمودار جذب-واجذب نانوسامانه سنتز شده در تحقیق حاضر مطابق با ایزوترم نوع چهارم دسته‌بندی IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) برای نمودارهای هم‌دما 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 می‌دهد.

اثر لایه سیلیکا بر خواص مغناطیسی نانوسامانه به وسیله آنالیز VSM بررسی شد. همان گونه که در تصویر شماره ۱۰ مشاهده می‌شود، مقدار مغناطش اشباع از ۶۰ واحد الکترومغناطیس بر گرم برای نانوذرات مگنتیت به ۰/۵ ± 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 وجود مقدار مغناطش اشباع این نانوسامانه در مقایسه با نانوکامپوزیت‌های مشابهی که دارای هسته‌ای متشکل از نانوذرات 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 گزارشی که با روشی مشابه با روش استفاده شده در مقاله حاضر نانوذرات مگنتیت را تولید کرد و با استفاده از سورفکتانت



تصویر شماره ۸: الگوی تفرق اشعه X نانوسامانه مگنتیت خوشه‌ای پوشیده شده با لایه نازک سیلیکا و پوسته سیلیکای متخلخل

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]



V_m	89.697	[cm^3(STP) g^{-1}]	$a_{S,BET}$	3.9040E+02	[m^2 g^{-1}]
C	56.613		Total pore volume(p/p_0=0.990)	0.2939	[cm^3 g^{-1}]
Mean pore diameter	3.0113	[nm]			

تصویر شماره ۹: ایزوترم جذب نیتروژن برای سامانه تولید شده

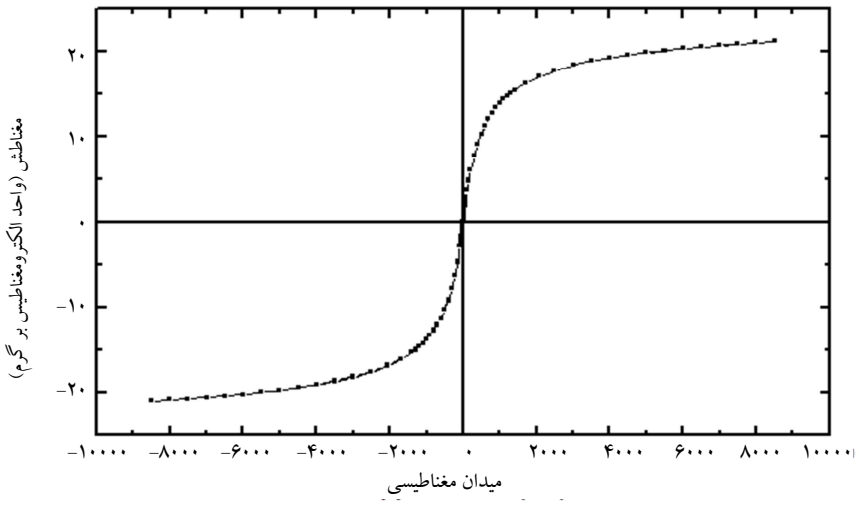
دیگری به عنوان الگو در تشکیل ساختار متخلخل، سطح نانوذرات مگنتیت را با سیلیکای متخلخل پوشش داده بودند، مقدار مغناطش اشباع نانوذرات مغناطیسی تولید شده با قطر ۲۸۷ نانومتر را ۴/۸۷ واحد الکترومغناطیس بر گرم گزارش کردند (۳۱) که بسیار کمتر از مغناظش اشباع ذرات تهیه شده در تحقیق حاضر می‌باشد (۳۲).

در تحقیق دیگری، مقدار مغناطش اشباع نانوذرات 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 درآوردند 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 (۳۱). نانوسامانه به دست آمده در تحقیق حاضر، دارای خاصیت سوپرپارامغناطیسی 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 گزارش‌های بعدی ارایه خواهند شد.

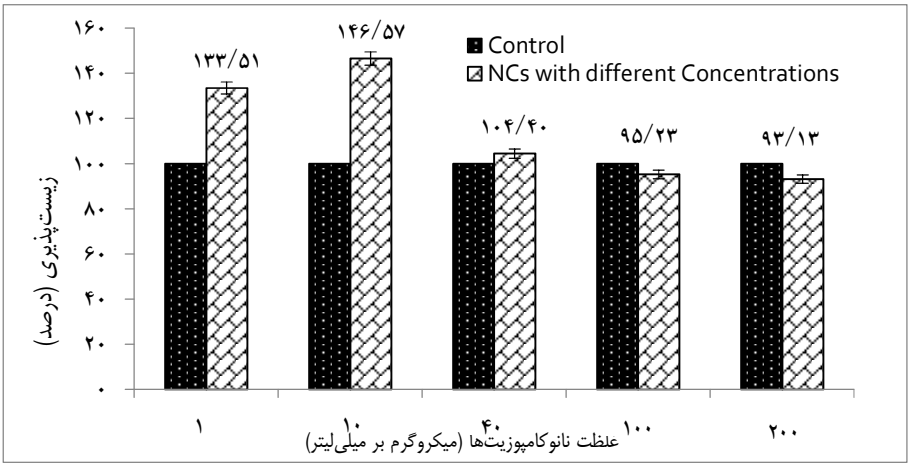
بررسی نتایج سمیت سلولی

به منظور بررسی دقیق‌تر 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 du-۱۴۵ و سلول شناور سرطان خون K۵۶۲ استفاده شد. آزمون استاندارد MTT که بر اساس توانایی سلول‌های زنده در تبدیل محلول بروماید تترازولیوم بلو تیازولیل به کریستال‌های نامحلول فورمازان آبی رنگ در میتوکندری آن‌ها انجام می‌شود، با غلظت‌های متفاوتی از نانوسامانه (۲۰۰-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اجرا شد (۳۴). نمودارهای به دست آمده برای هر دو سلول تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوسامانه به مدت ۲۴ ساعت در تصاویر شماره ۱۱ و ۱۲ ارایه شده است. برای هر دو نوع سلول مشاهده می‌شود که قابلیت زنده ماندن

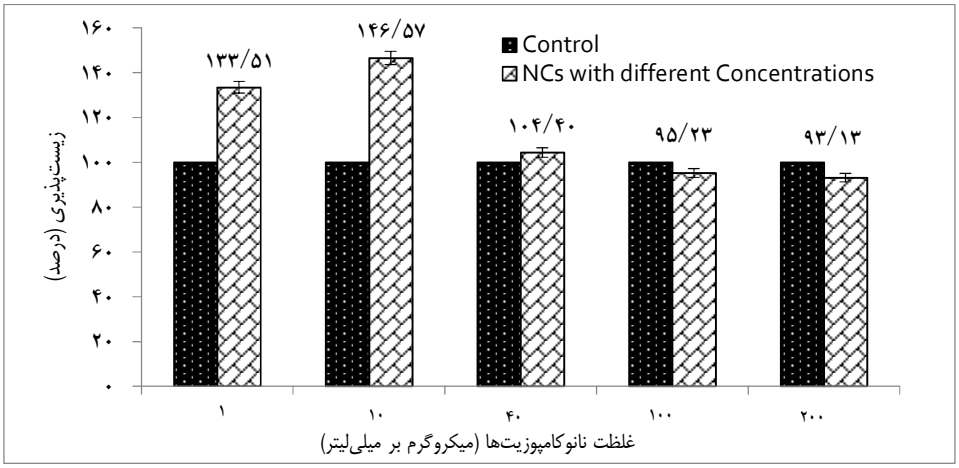
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]



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



تصویر شماره ۱۱: نمودار MTT (3-[4,5-dimethylthialzol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
برای سلول‌های DU-۱۴۵ بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف از نانوسامانه تولید شده

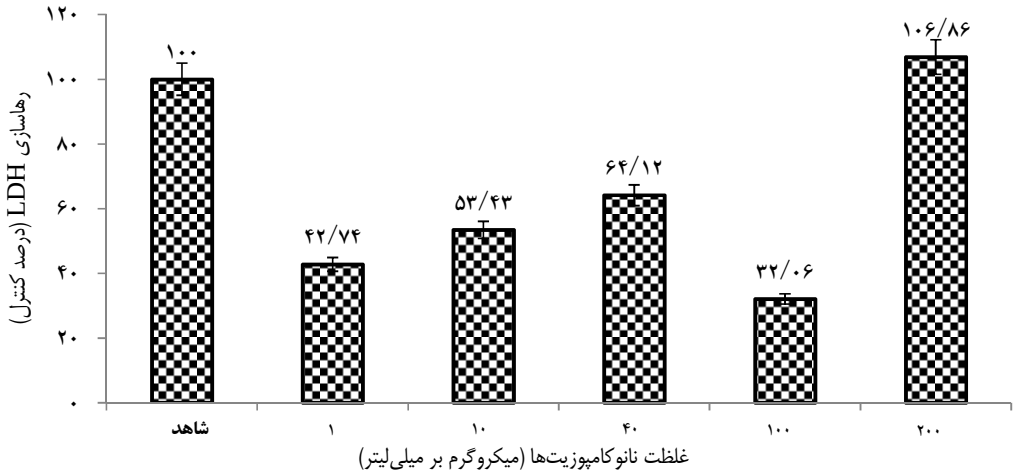


تصویر شماره ۱۲: نمودار MTT (3-[4,5-dimethylthialzol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
برای سلول‌های K۵۶۲ بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف از نانوسامانه تولید شده

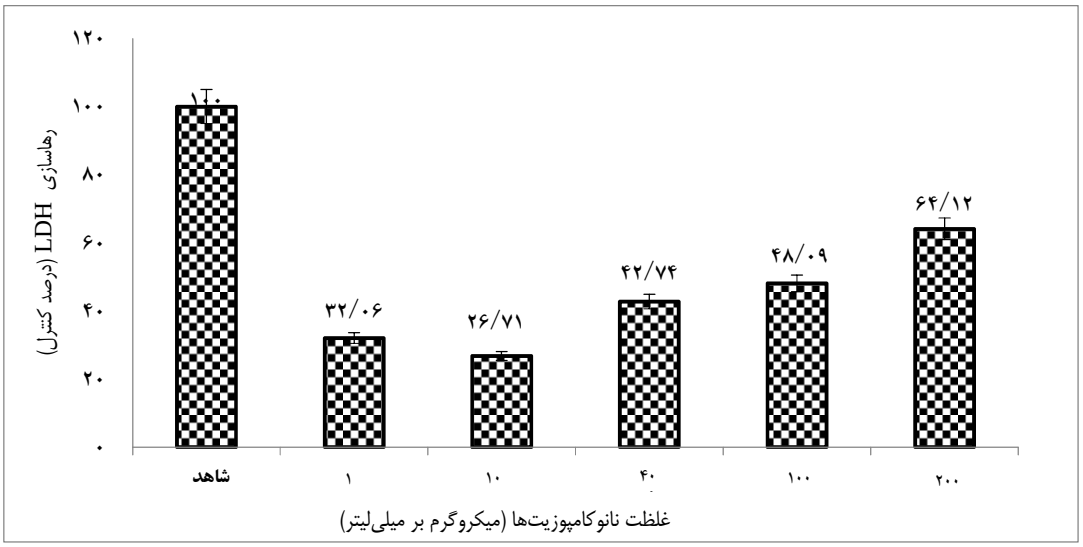
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

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

سنجش LDH نیز برای ارزیابی سلامت غشای سلولی به کار می‌رود؛ 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 می‌باشد 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 DU-۱۴۵ و K۵۶۲ تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذره نشان می‌دهد. بعد از تیمار کردن سلول‌ها با نانوسامانه به مدت ۲۴ ساعت و نمونه‌گیری از سرم رویی سلول‌ها، سطح LDH سلول‌های تیمار شده با نانوسامانه در حضور غلظت‌های ۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوسامانه حتی نسبت به سطح LDH سلول‌های کنترل نیز کاهش قابل توجهی داشت و تنها در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوسامانه افزایش بسیار ناچیزی در مقایسه با سلول‌های کنترل مشاهده شد. نتایج به دست آمده از دو سنجش فوق نشان می‌دهد که نانوسامانه ساخته شده دارای خاصیت زیست سازگاری قابل توجهی بوده است و اثر سمیتی بر سلول‌های مورد آزمایش در این تحقیق نداشته است.



تصویر شماره ۱۳: نمودار LDH (Lactate dehydrogenase) برای سلول‌های DU-۱۴۵ بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف از نانوسامانه تولید شده



تصویر شماره ۱۴: نمودار LDH (Lactate dehydrogenase) برای سلول‌های K۵۶۲ بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف از نانوسامانه تولید شده

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

بحث

مطالعه در زمینه اثر سمیت سلولی نانوذرات از جنس سیلیکا بر روی سلول‌های 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 پزشکی تأیید شده است. به عنوان مثال، در تحقیقی سمیت سلولی نانوذرات سیلیکای متخلخل با اندازه تقریبی ۲۰۰ نانومتر بر روی سلول‌های Caco-۲ بررسی شد و نتایج آن نشان داد که نانوذرات فوق دارای اثر سمیت سلولی ناچیزی بر سلول‌های مربوطه بوده‌اند (۳۵). در تحقیق دیگری، سمیت سلولی نانوکامپوزیت هسته- پوسته با اندازه تقریبی ۸۶ نانومتر شامل هسته مغناطیسی نانوذرات مگنتیت خوشه‌ای شده توسط محلول استون- هگزان پوشیده شده با لایه سیلیکای غیر متخلخل در غلظت‌های مختلف از نانوکامپوزیت بر سلول‌های MG U-۲۵۱ glioma بررسی شد و نتایج آن نشان داد که حتی در غلظت‌های بالا تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از این نانوکامپوزیت نیز سمیت سلولی قابل توجهی ایجاد نمی‌شود (۳۱).

پژوهش دیگری نیز عدم سمیت سلولی نانوکامپوزیت هسته- پوسته با اندازه ۹۷ نانومتر شامل هسته نانوذرات مگنتیت و پوسته سیلیکای متخلخل و مولکول‌های پلی‌اتیلن گلیکول (Polyethyleneglycol) بر سلول‌های سرطان سینه MCF-۷ تا غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوکامپوزیت 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 آن‌ها در منابع ارایه نشده است؛ 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 نانوسامانه‌ای ذره‌ای شکل متشکل از یک هسته مغناطیسی و دو لایه از جنس سیلیکا (یک لایه داخلی غیر متخلخل و یک لایه خارجی متخلخل) با اندازه میانگین ۱۸۰ نانومتر تهیه شد. هسته این نانوسامانه شامل خوشه‌ای از نانوذرات مگنتیت با اندازه ۸۰ نانومتر بود. به منظور جلوگیری از اکسایش، این هسته با لایه نازکی از سیلیکای غیر متخلخل با ضخامت ۲۰ نانومتر پوشانده شد. پوسته خارجی نیز که متشکل از لایه‌ای از سیلیکای متخلخل با ضخامت ۳۰ نانومتر، مساحت سطحی بالا و توزیع باریک 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 دلیل وجود خوشه نانوذرات مگنتیت در هسته بالا می‌باشد و نانوسامانه به دست آمده دارای خاصیت سوپرپارامغناطیسی است. ویژگی مذکور، این نانوسامانه را به عنوان یک ماده حاجب برای MRI مناسب می‌سازد. از طرفی آزمایش‌های بررسی سمیت سلولی نانوسامانه به دست آمده بر دو نوع دودمان سلولی متفاوت نشان دادند که این نانوسامانه دارای سمیت سلولی در محدوده غلظت به کار گرفته شده برای ذرات نبوده است و با توجه به ویژگی‌های سطحی مناسب می‌تواند به عنوان حامل انتقال دارو به کار رود. با توجه به اندازه به دست آمده (کمتر از ۲۰۰ نانومتر) و ویژگی‌های قابل توجه دیگر، این نانوسامانه دارای قابلیت‌های لازم اولیه برای استفاده هم‌زمان در MRI و همچنین به عنوان یک سامانه برای حمل و انتقال دارو است. بررسی بیشتر این مسأله، موضوع تحقیقات بعدی این 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 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

5. Shi Y. Superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging (MRI) diagnosis [Thesis]. Adelaide SA: School of Chemical Engineering, The University of Adelaide; 2006.
6. 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.
7. Varadan VK, Chen LF, Xie J. Nanomedicine: Design and Applications of Magnetic Nanomaterials, Nanosensors and Nanosystems. New Jersey, NJ: John Wiley & Sons; 2008.
8. Thorek DL, Chen AK, Czupryna J, Tsourkas A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. Ann Biomed Eng 2006; 34(1): 23-38.
9. 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.
12. 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 nanoparticle-based drug delivery and diagnosis. J Drug Target 2007; 15(3): 163-83.
14. 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.
18. 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.
30. Naumov S. Hysteresis Phenomena in Mesoporous Materials [Thesis]. Leipzig, Germany: University of Leipzig; 2009.
31. 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]