

## Preparation and Characterization of Doxorubicin Loaded Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG Nanoparticles on AGS and MCF-7 Cancer Cells

Jahazi Sh.<sup>1</sup> MSc, Yaghoubi H.\*<sup>1</sup> PhD, Akbari H.<sup>2</sup> PhD

<sup>1</sup> Biology Department, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

<sup>2</sup> Physics Department, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

### Abstract

Iron oxide nanoparticles are one of the nanocarriers that are suitable for novel drug delivery systems due to low toxicity, biocompatibility, loading capacity and controlled drug delivery to cancer cells. The purpose of the present study is the synthesis of coated iron oxide nanoparticles for the delivery of doxorubicin (DOX) and its effects on cancer cells.

In this study, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles were synthesized by Polyol method, and then doxorubicin was loaded onto PEGylated iron oxide nanoparticles. FT-IR was used to ensure PEG binding to nanoparticles and loading the drug onto nanoshell. Comparison of the mean size and the crystalline structure of nanoparticles were performed by TEM and X-ray diffraction pattern. Then, the effect of cytotoxicity was evaluated on AGS and MCF-7 cancer cells by MTT assay.

According to FT-IR results, the presence of O-H and C-H bands at 2927cm<sup>-1</sup> and 3392cm<sup>-1</sup> peaks correlate with PEG binding to nanoparticles. XRD pattern showed the cubic spinel structure of trapped magnetite nanoparticles carrying medium with a mean size of 14nm. 21.67% of doxorubicin was loaded into Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG nanoparticles, which the highest drug release recorded during the first 24 hours. IC50 values at 24, 48, and 72 hours for treatment with carriers of PEGylated nanoparticles for MCF-7 cell lines were 38, 24 and 16μM, and for AGS cell lines were 42, 31 and 21μM, respectively (p<0.05). This study showed that PEGylation of iron oxide nanoparticles and using them in the drug delivery process could be beneficial for increasing the effect of doxorubicin on AGS and MCF-7 cancer cells.

### Keywords

Polyethylene Glycol [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68011092>];

Doxorubicin [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68004317>];

Iron Oxide Nanoparticles [Not in MeSH];

MCF-7 Cancer Cells [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=MCF-7+Cancer+Cells>]

---

\*Corresponding Author

Tel: -

Fax: +98 (45) 33727799

Post Address: Biology Department, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran. Postal code: 5615731567

yaghoubi\_h@iauardabil.ac.ir

Received: December 12, 2018

Accepted: October 22, 2019

ePublished: March 14, 2020

## آماده‌سازی و بررسی خصوصیات نانوذرات $Fe_3O_4$ -PEG حامل دوکسوروبیسین روی سلول‌های سرطانی AGS و MCF-7

شیدا جهانی MSc

گروه زیست‌شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

هاشم یعقوبی\* PhD

گروه زیست‌شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

حسین اکبری PhD

گروه زیست‌شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

### چکیده

نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن از نانوحامل‌هایی هستند که به دلیل ویژگی‌هایی همچون سمیت پایین، زیست‌سازگاری، قابلیت بارگیری و انتقال کنترل‌شده دارو به سلول‌های سرطانی، گزینه مناسبی در دارورسانی نوین محسوب می‌شوند. هدف از مطالعه حاضر سنتز نانوذرات اکسید آهن پوشش‌دار به منظور تحویل داروی دوکسوروبیسین (DOX) و بررسی تاثیرات آن روی سلول‌های سرطانی است.

در این مطالعه نانوذرات مغناطیسی  $Fe_3O_4$  به روش پلی‌ال سنتز شدند و سپس دوکسوروبیسین روی نانوذرات اکسید آهن پگیله‌شده بارگذاری شد. برای اطمینان از اتصال PEG به نانوذرات و بارگیری دارو روی نانوذرات از تکنیک FT-IR استفاده شد. مقایسه اندازه متوسط و ساختار بلوری نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری و الگوی پراش X انجام شد. اثر سمیت سلولی آنها روی سلول‌های سرطانی AGS و MCF-7 توسط سنجش MTT مورد بررسی قرار گرفت.

طبق نتایج FT-IR حضور باندهای O-H و C-H در پیک  $3392\text{cm}^{-1}$  و  $2927\text{cm}^{-1}$  اتصال PEG به نانوذرات را تایید کرد. الگوی XRD ساختار اسپینل مکعبی نانوذرات مگنتیت پگیله‌شده حامل دارو با متوسط اندازه ۱۴ نانومتر را نمایش داد.  $21/67\%$  دوکسوروبیسین در نانوذرات  $Fe_3O_4$ -PEG بارگذاری شد که در ۲۴ ساعت اول بیشترین مقدار رهایش دارو ثبت شد. مقادیر IC50 در تیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته با نانوذرات پگیله‌شده حامل دارو، برای سلول‌های رده MCF-7 به ترتیب ۳۸، ۲۴ و ۱۶ میکرومولار و برای سلول‌های رده AGS به ترتیب ۴۲، ۳۱ و ۲۱ میکرومولار تعیین شدند ( $p < 0.05$ ).

نتایج نشان داد که پگیله‌کردن نانوذرات اکسید آهن برای افزایش اثر داروی دوکسوروبیسین بر سلول‌های سرطانی AGS و MCF-7 می‌تواند مفید باشد.

**کلیدواژه‌ها:** پلی‌اتیلن‌گلیکول، دوکسوروبیسین، نانوذرات اکسید آهن، سلول‌های سرطانی MCF-7

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۳۰

\*نویسنده مسئول: yaghoubi\_h@iauardabil.ac.ir

### مقدمه

سرطان، بیماری مهلکی است که از دیرباز دامن‌گیر بشر شده است. به‌کارگیری نانوذرات مغناطیسی در پزشکی توجه بسیاری از پژوهشگران را طی دو دهه اخیر در حوزه تشخیص و درمان سرطان به خود جلب کرده است. سرطان سینه اولین سرطان شایع در زنان است [1]. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی، از هر ۸ تا ۱۰ زن یک نفر دچار سرطان سینه می‌شود که سن بروز آن در زنان ایرانی حداقل یک دهه کمتر از زنان کشورهای توسعه‌یافته است [2, 3]. از طرفی

سرطان معده نیز چهارمین سرطان شایع و دومین سرطان منجر به مرگ در جهان شناخته شده است که بیشترین میزان مرگ و میر را در کشورهای در حال توسعه به‌ویژه شرق آسیا دارد [4]. شیمی‌درمانی به‌عنوان راهکاری متداول برای درمان سرطان‌ها و افزایش طول عمر بیماران به کار می‌رود [5]. موفقیت در شیمی‌درمانی سرطان نیازمند تحویل غلظت کافی دارو به سلول‌های تومور بدون ایجاد اثر سمیت برای سلول‌های سالم بیمار است. دوکسوروبیسین یک داروی ضدسرطان است که با اتصال به DNA و مهار ساخت نوکلئیک‌اسید از طریق ایجاد اختلال در ساختمان مولکولی و ایجاد ممانعت فضایی مانع رشد و پیشرفت سلول‌های سرطانی در بدن می‌شود. تزریق مستقیم دوکسوروبیسین به دلیل سمیت بالای دارو، پایداری کم در سیستم گردش خون، نفوذ دشوار در بافت سرطانی، تقلیل قدرت عملکرد دارو توسط آنزیم‌های تجزیه‌کننده درون بدن و یا اثرات جانبی ناشی از نفوذ آنها به نواحی سالم بدن، ممکن است اثرات زیان‌آوری در پی داشته باشد [6]. بنابراین طراحی داروهای هوشمند، یک مساله مهم در سیستم دارورسانی نوین است [7]. سیستم‌های دارورسانی بر پایه فناوری نانو به سبب تغییر فارماکوکینتیک دارو، افزایش مدت زمان حضور دارو در جریان خون، کاهش سمیت و افزایش نیمه عمر دارو موجب بهبود چشمگیر در درمان‌های دارویی شده‌اند [8]. نانوذرات مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ) به‌عنوان گزینه مناسب نانوحامل‌های هوشمند، دارای خصوصیات نظیر سطح فعال بسیار وسیع برای واکنش، اندازه و توزیع مناسب برای عبور از رگ‌های خونی، زیست‌سازگاری بالا، ظرفیت بالا برای حمل دارو، سمیت زیستی پایین و قابلیت تجمع در بافت هدف هستند [9-11]. همچنین نانوذرات مگنتیت موجب افزایش کنترل‌شده سمیت سلولی داروهای ضدسرطانی می‌شوند و به همین سبب نقش مهمی را در انتقال دارو به سلول‌های توموری ایفا می‌کنند [12, 13]. با وجود ویژگی‌های متعدد نانوحامل‌های مگنتیت، سرعت رهایش دارو در محیط فیزیولوژیکی بافت هدف از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [14]. امروزه به‌منظور کاربرد مفید و موثر نانوذرات در سیستم‌های بیولوژیک پوشش‌های مختلفی نظیر آلبومین، پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG)، دکستران، پولوکسامر، کیتوسان و پلی‌اتیلن‌اکسید بر سطح آنها ایجاد می‌شود [15, 16]. پلی‌اتیلن‌گلیکول زیست‌سازگاری خوبی دارد و از برهم‌کنش‌های آب‌گریز و الکتروستاتیک ممانعت به عمل می‌آورد و نیمه عمر نانوذرات را در گردش خون تا چندین برابر افزایش می‌دهد [17]. حضور چنین پوشش‌هایی به پایداری نانوذرات در محلول‌های بیولوژیک و گردش خون، کاهش اثر سمی، توزیع بافتی و رهایش کنترل‌شده دارو در سلول‌ها کمک می‌کند [18, 19]. در مطالعه حاضر که به‌صورت آزمایشگاهی انجام شد، نانوذرات اکسید آهن ( $Fe_3O_4$ ) با روش پلی‌ال (Polyol) سنتز شدند و داروی دوکسوروبیسین روی نانوحامل بارگذاری شد. در ادامه تاثیر سمیت زیستی در انتقال داروی دوکسوروبیسین به‌صورت آزاد و محصورشده با نانوذرات اکسید آهن PEG دارشده روی رده‌های سلول‌های سرطانی MCF-7 و AGS بررسی شد.

انکپسوله‌سازی مقایسه شد (۳ بار تکرار). براساس داده‌های حاصل از جذب نوری، درصد بارگیری دارو با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

میزان داروی بارگذاری‌نشده-میزان داروی اولیه = میزان داروی محصورشده

$$100 \times \frac{\text{میزان داروی محصورشده}}{\text{کل دارو}} = \text{بارگذاری دارو (درصد)}$$

### بررسی رهایش دوکسوروبیسین از نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG

میزان رهایش دوکسوروبیسین از نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG، براساس مقایسه دوکسوروبیسین آزادشده از نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG/DOX به دست آمد. به این منظور مقدار ۱۰ میلی‌گرم از فرمولاسیون تهیه‌شده، در ۱۰ میلی‌لیتر PBS با pH برابر ۷/۴ اضافه شد. سوسپانسیون‌های حاصل به مدت ۲۴ ساعت روی انکوباتور شیکر با دمای ۳۷°C و سرعت ۴۵ دور بر دقیقه نگهداری شدند. نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG/DOX با سرعت ۱۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ و پس از خارج کردن محلول رویی مجدداً ۱۰ میلی‌لیتر بافر PBS به هر یک از تیمارها اضافه شد. سپس سایر مراحل فوق برای زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت نیز انجام شدند. میزان داروی آزادشده در مدت ۲۴ ساعت در بافر PBS به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و درصد رهایش دارو با مقایسه داروی رهاسازی‌شده و مقدار داروی لودشده محاسبه شد. به‌منظور محاسبه درصد داروی رهاسازی‌شده در مدت زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت درصد این دارو در مدت زمان‌های قبلی نیز در نظر گرفته شد.

### مشخصه‌یابی نانوذرات مگنتیت

به‌منظور شناسایی فاز نانوذرات مگنتیت سنتز شده، برای تعیین اندازه، خواص ساختاری، خواص اپتیکی، مورفولوژی و ریخت‌شناسی به ترتیب با دستگاه‌های پراش اشعه ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مورد آنالیز و بررسی قرار گرفتند. برای تعیین فازهای بلورین (کریستالی) نانوذرات مگنتیت سنتز شده، از الگوی پراش اشعه ایکس، مدل Philips X'pert Pro (Philips؛ هلند) با منبع لامپ آند مسی Cu K $\alpha$  با طول موج  $\lambda$  برابر ۰۰۶۵۴۰ نانگستروم استفاده شد. میانگین اندازه کریستال‌ها با استفاده از معادله شرر ( $d = k\lambda / \beta \cos\theta$ ) تعیین شد که در آن  $\beta$  عرض پیک در نصف ارتفاع بیشینه بر حسب درجه،  $\lambda$  طول موج پرتو بر حسب نانومتر،  $\theta$  زاویه پراش بلندترین پیک بر حسب درجه و  $d$  قطر میانگین دانه‌ها بر حسب نانومتر است. این دستگاه قابلیت آنالیز نمونه‌ها را به‌صورت پودر، لایه‌های نازک و همچنین حالت ژله‌ای یا خمیری ماده مورد نظر دارد. برای تعیین اندازه و توزیع پراکندگی نانوذرات مگنتیت سنتز شده، میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل LEO-912AB با ولتاژ اعمالی ۱۲۰ کیلوولت برای گسیل اشعه الکترونی استفاده شد. برای آماده‌سازی نمونه در تصویربرداری TEM از حلال مناسب نانوذرات استفاده می‌شود که همگنی

## مواد و روش‌ها

### مواد

در این مطالعه رده‌های سلولی AGS و MCF-7 (انستیتو پاستور؛ ایران) خریداری و در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰% سرم گاوی و ۲۰% پنی‌سیلین-استرپتومایسین تکثیر و نگهداری شدند. محلول MTT و FBS (سیگما؛ ایالات متحده)، محیط کشت RPMI-1640 و محلول‌های تریپسین (Trypsin) و پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Gibco؛ ایالات متحده) نیز تهیه شدند. برای سنتز نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG مواد آهن‌III استیل‌استانات، NH<sub>4</sub>OH، 1,2-Hexadecanediol، اولئیک‌اسید و اولئیل‌آمین، فنیل‌اتر، اتانول، هگزان و پلی‌اتیلن‌گلیکول (سیگما آلدیچ؛ ایالات متحده) و نیز دوکسوروبیسین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (Ebewe Pharma؛ استرالیا) خریداری شدند.

### سنتز نانوذرات فریت مغناطیسی Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> به روش Polyol

سنتز نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>، با ترکیب پیش‌ماده‌ها به نسبت ۲ میلی‌مول Fe(acac)<sub>3</sub>، ۵ میلی‌مول 1,2-Hexadecanediol، ۶ میلی‌مول اولئیک‌اسید و ۶ میلی‌مول اولئیل‌آمین در دمای اتاق و در حضور گاز نیتروژن انجام شد. دمای واکنش ابتدا به ۱۰۰°C رسانده شد تا احیای اتم‌های آهن حاصل و هسته‌بندی شروع شود. پس از تشکیل هسته، دمای واکنش به آرامی تا دمای ۲۰۰°C رسید تا پیش‌ماده‌ها کامل حل شوند و پیوندهای کاملی بین کاتیون‌های فلزی و سورفکتانت‌ها حاصل شود. سپس محلول در دمای ۲۵۹°C به مدت یک ساعت حرارت داده شد. بعد از اتمام واکنش و انجام خالص‌سازی با سانتریفیوژ و اتانول (سه بار)، در نهایت نانوذرات مگنتیت خالص حاصل و در هگزان حل شدند.

### پگیله کردن نانوذرات مگنتیت

به این منظور ۱/۵ گرم از نانوذرات مگنتیت حل‌شده در ۵۰ میلی‌لیتر آب استریل، به ۱ گرم پلی‌اتیلن‌گلیکول حل‌شده در ۵۰ میلی‌لیتر آب استریل اضافه و pH محلول روی ۱۰ تنظیم شد. سوسپانسیون تهیه‌شده به مدت ۴۸ ساعت روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. رسوب ته‌نشین‌شده ۵ بار با آب استریل شست‌وشو و در آن خلاء خشک شد.

### بارگیری دوکسوروبیسین به سطح ذرات پگیله‌شده

به‌منظور بارگذاری دوکسوروبیسین توسط نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG مقدار ۶ میلی‌گرم از نانو ذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG با ۱ میلی‌لیتر محلول دوکسوروبیسین با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ترکیب و به مدت ۲۶ ساعت در دمای اتاق توسط همزن مغناطیسی با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه مخلوط شد. سپس نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG/DOX سه مرتبه با آب استریل شست‌وشو و با سانتریفیوژ با سرعت ۱۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه جداسازی و توسط خشک‌کن انجمادی خشک شدند. به‌منظور بررسی درصد بارگذاری دارو، پس از سانتریفیوژ نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG/DOX، محلول رویی جمع‌آوری، سپس عدد جذبی آنها در ۴۸۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری تعیین و با عدد جذبی دوکسوروبیسین اولیه مورد استفاده در فرآیند

در طیف C علاوه بر پیک‌های نانوذرات مگنتیت، پیک C-O-C کششی متقارن پلی‌اتیلن‌گلیکول در  $1052\text{cm}^{-1}$  مشاهده می‌شود. پیک در  $1618\text{cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات کششی C-C و در  $565\text{cm}^{-1}$  مربوط به  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$  است که در نانوذرات مگنتیت پوشش‌داده‌شده با PEG مشاهده می‌شود. پیک پیوندهای هیدروکسی H-OH در  $3365\text{cm}^{-1}$  و  $2345\text{cm}^{-1}$  مربوط به پیک‌های خمشی هستند. حضور پیوندهای O-H و C-H در پیک  $3392\text{cm}^{-1}$  و  $2927\text{cm}^{-1}$  در نانوذرات پگیله‌شده، اتصال PEG به نانوذرات را تایید می‌کند. در طیف d علاوه بر پیک‌های نانوذرات، پیک‌های مربوط به دارو نیز مشاهده می‌شوند. باند مشاهده‌شده در  $1636\text{cm}^{-1}$  به دلیل N-H خمشی خارج صفحه‌ای در داروی خالص (a) است و همچنین پیک  $3430\text{cm}^{-1}$  مربوط به N-H و H-O ارتعاشی است. از نتایج FT-IR می‌توان نتیجه گرفت که دارو بین لایه‌های اطراف نانوذرات مگنتیت بارگیری شده است.

#### نتایج بررسی پراش اشعه X (XRD)

نتایج حاصل از بررسی ساختاری (XRD) نمونه‌ها در نمودار ۲ مشاهده می‌شود. با مقایسه این شکل با الگوی استاندارد کارت مگنتیت (JCPDS card No. 86-2267) مشخص می‌شود که تمامی پیک‌ها منطبق بر فاز غالب نانوذرات مگنتیت با ساختار اسپینل مکعبی هستند. نانوذرات الگوی C تغییر چندانی نسبت به الگوی b نداشته‌اند، فقط پهن‌شدگی برای الگوی پراش (c) اتفاق افتاده که دلیل آن تاثیر پلیمر پلی‌اتیلن‌گلیکول است. کمترین شدت پیک‌ها مربوط به مگنتیت پگیله‌شده حامل دارو (d) است که بارگذاری دارو را تایید می‌کند. همچنین اندازه کریستال‌ها برای نانوذرات پگیله‌شده و حامل دارو  $14$  نانومتر محاسبه شد.

#### نتایج بررسی مورفولوژی

شکل ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود نانوذرات از توزیع مناسبی برخوردارند و دارای مورفولوژی کروی هستند. اندازه متوسط نانوذرات بدون پوشش و پوشش‌دار به ترتیب حدود  $12$  و  $14$  نانومتر اندازه‌گیری شد. اگرچه توزیع اندازه ذرات با اعمال پوشش پلیمری بزرگتر شده است، اما مورفولوژی سطحی و شکلی ثابت مانده و تغییری نکرده است.

#### بررسی درصد بارگذاری و رهایش دوکسوروبیسین از نانوذرات

##### $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG/DOX}$

نتایج حاصل از بررسی مقایسه میانگین درصد اختلاف دوکسوروبیسین موجود در سوپرناتانت و دوکسوروبیسین مورد استفاده در فرآیند بارگذاری نشان داد که  $21/67\%$  مقدار داروی مورد استفاده در فرآیند بارگذاری توسط نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG}$  بارگذاری شده است. همچنین نتایج حاصل از رهایش دوکسوروبیسین نشان داد که رهایش دوکسوروبیسین از نانوذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG}$  به صورت انفجاری بوده است، به طوری بیش از  $80\%$  کل داروی رهاسازی‌شده در مدت  $72$  ساعت تنها در  $24$  ساعت اول رهاسازی شده است (نمودار ۳).

نانوذرات با دستگاه التراسونیک به مدت یک ساعت انجام شد. مقدار بسیار کمی توسط پیپت از این محلول روی شبکه‌های پوشیده‌شده با کربن قرار داده شد تا لایه نازکی از نمونه حاصل و آماده تصویربرداری شود. طیف‌های مادون قرمز نمونه‌ها با دستگاه Brucker مدل Tehsor27 (Brucker؛ آلمان) با استفاده از قرص KBr ثبت شدند. در روش مادون قرمز ارتعاش پیوندها بررسی می‌شود که در اثر تغییر طول پیوند و یا زاویه پیوند در مولکول‌ها انجام می‌شود. در آنالیز بارگذاری و رهایش دارو، طیف‌سنجی نور مرئی با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV2550 انجام شد.

#### بررسی سمیت سلولی

بررسی سمیت نانوذرات سنتز شده با روش MTT انجام شد. ابتدا سلول‌های رده سلولی AGS و MCF-7 در غلظت  $7000$  سلول در داخل هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده و به مدت  $24$  ساعت در  $\text{CO}_2$  (۵٪) انکوبه شدند. سه تیمار  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG}$ ،  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  و  $\text{DOX}$  به ترتیب با غلظت‌های صفر،  $3/125$ ،  $6/25$ ،  $12/5$ ،  $25$ ،  $50$  میکروگرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌های حاوی محیط کشت اعمال شدند و سپس آزمایش MTT (با غلظت  $5$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS) در بازه‌های  $24$ ،  $48$  و  $72$  ساعت انجام و جذب نوری سلول‌ها توسط دستگاه الیزاریدر در طول موج  $570$  نانومتر خوانده شد. به این ترتیب درصد زنده‌مانی پس از  $3$  مرتبه تکرار با استفاده از معادله زیر برای دوکسوروبیسین، نانوذرات پگیله‌شده و نانوذرات پگیله‌شده حامل دوکسوروبیسین محاسبه و مقایسه شد.

$$\text{درصد} = \frac{\text{میانگین جذب نوری محیط کشت} - \text{میانگین جذب نوری گروه کنترل}}{\text{میانگین جذب نوری محیط کشت} - \text{میانگین جذب نوری گروه کنترل}} \times 100$$

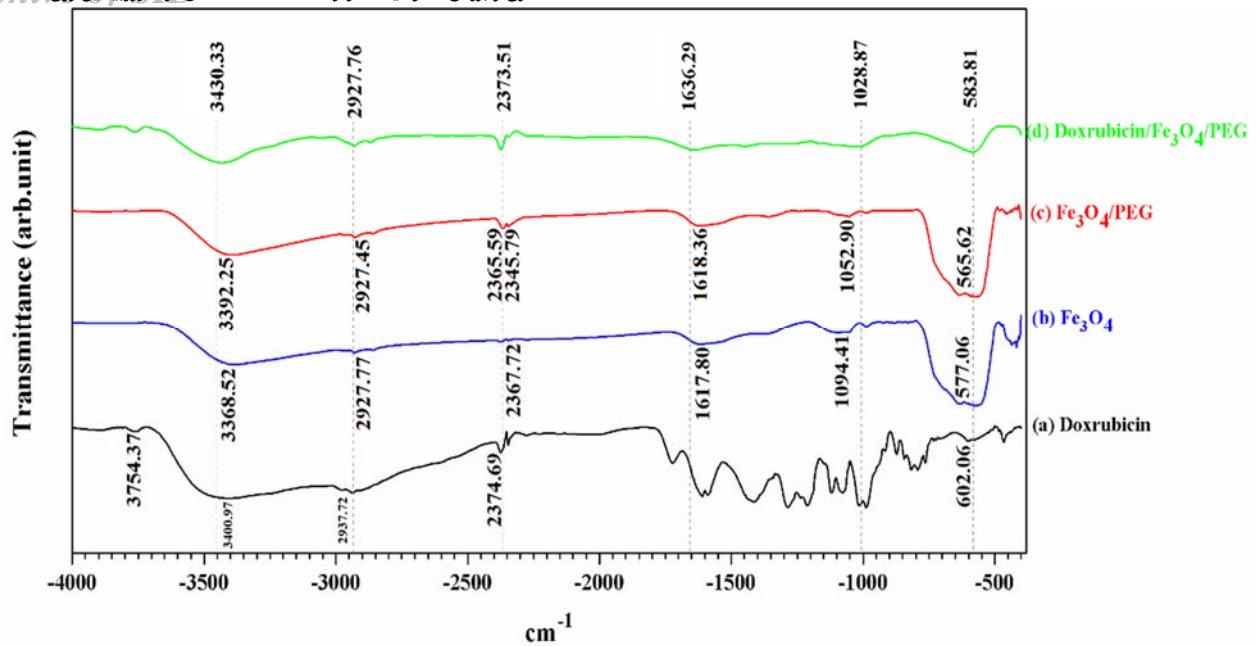
زنده‌مانی

داده‌ها استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل شدند. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. میانگین آماری هر یک از تیمارها محاسبه و سطح معنی‌داری آزمون  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد.

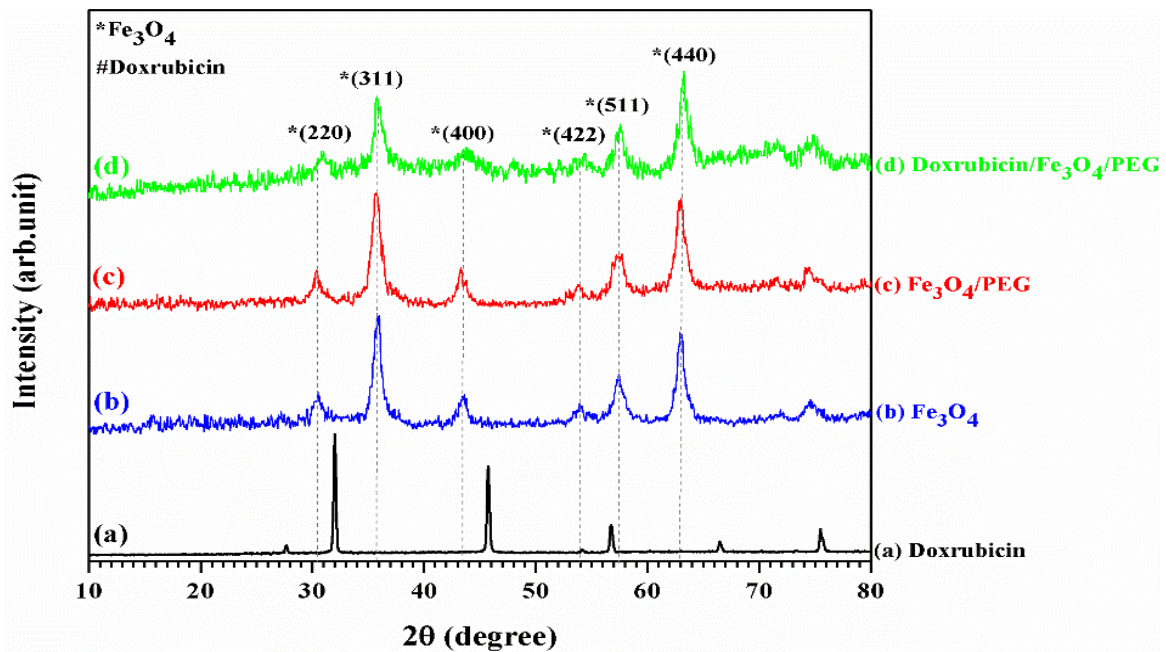
#### یافته‌ها

##### نتایج طیف‌سنجی FT-IR

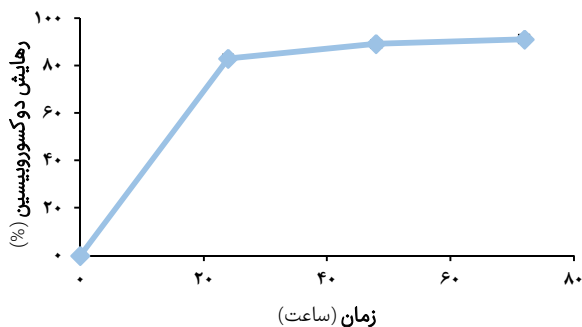
نتایج طیف‌سنجی FT-IR در نمودار ۱ (a تا d) نمایش داده شده است. پیک قوی و مشخص اکسید آهن (طیف b، c و d) مربوط به ارتعاشات کششی Fe-O در محدوده  $583\text{cm}^{-1}$  است. در این حالت، تعداد زیادی از پیوند اتم‌های سطحی می‌شکنند که منجر به نوآرایی الکترون‌ها روی سطح نانوذرات می‌شود. در نتیجه ثابت نیروی پیوند سطحی با کاهش ابعاد  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  در حد نانو، افزایش می‌یابد. در طیف b پیک‌های موجود در  $3368\text{cm}^{-1}$  و  $2927\text{cm}^{-1}$  به ترتیب، مربوط به ارتعاشات کششی و خمشی گروه‌های هیدروکسیل سطح هستند.



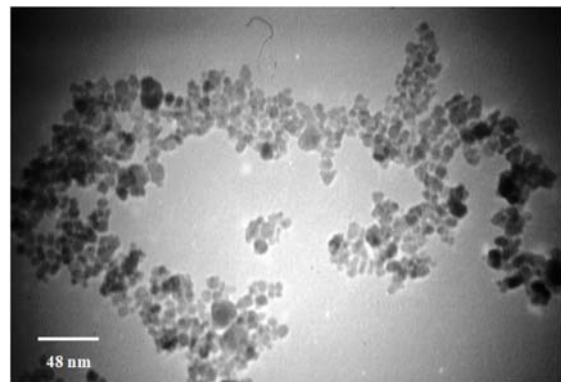
نمودار ۱) طیف‌سنجی FT-IR: (a) دوکسوروبیسین؛ (b) نانوذرات مگنتیت؛ (c) نانوذرات مگنتیت پگیله‌شده؛ (d) نانوذرات پگیله‌شده حامل دارو



نمودار ۲) مقایسه الگوهای XRD: (a) دوکسوروبیسین؛ (b) نانوذرات مگنتیت؛ (c) نانوذرات مگنتیت پگیله‌شده؛ (d) نانوذرات پگیله‌شده حامل دارو



نمودار ۳) درصد رهایش دوکسوروبیسین از نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG در مدت زمان‌های متفاوت

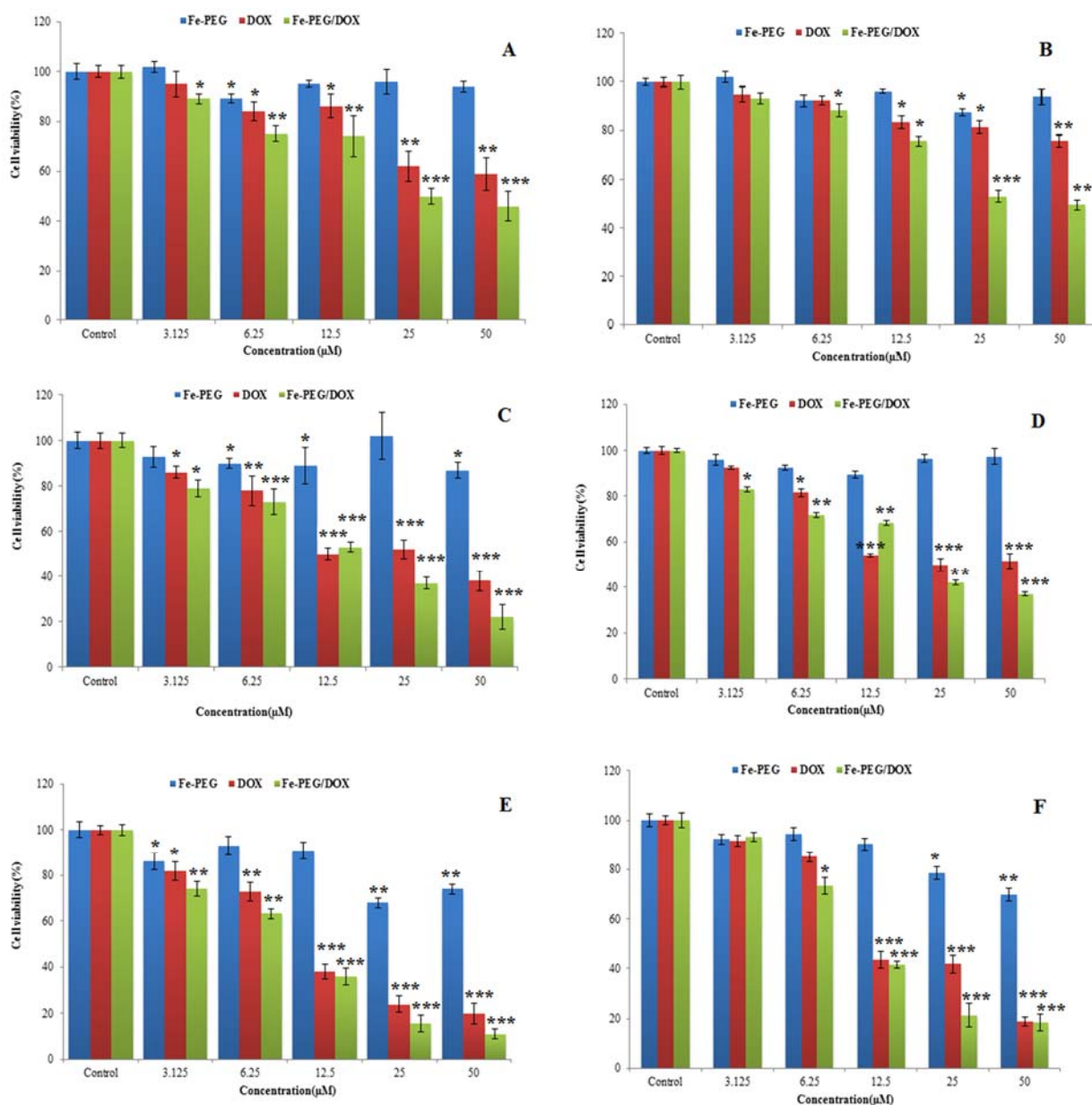


شکل ۱) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG

نانوذرات مگنتیت PEG دارنده بدون دارو، اثر سمیت چندانی روی رده‌های سلول‌های سرطانی از خود نشان نداد، در صورتی که داده‌های حاصل از انواع PEG دارنده آنها با داروی دوکسوروبیسین نشان داد که اثر سمیت وابسته به زمان و غلظت است و بیشترین اثر سمیت روی هر دو رده سلول سرطانی به غلظت ۵۰ میکرومول و بازه زمانی ۷۲ مربوط می‌شود. با توجه به نمودارهای حاصل از تیمار دو رده سلولی مشاهده شد که میزان مرگ و میر سلول‌های AGS در مقایسه با سلول‌های MCF-7 نسبتاً کمتر است و از مقاومت بیشتری در مقابل دارو برخوردار هستند. مقادیر IC50 در تیمار ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته با نانوذرات پیگیده شده حامل دارو، برای سلول‌های رده MCF-7 به ترتیب ۳۸، ۲۴ و ۱۶ میکرومولار و برای سلول‌های رده AGS به ترتیب ۴۲، ۳۱ و ۲۱ میکرومولار تعیین شد.

### نتایج بررسی سمیت سلولی روی رده سلولی AGS و MCF-7

نتایج اثر مستقیم داروی دوکسوروبیسین و نانوذرات پیگیده شده حامل دوکسوروبیسین بر رده سلولی AGS و MCF-7 در نمودار ۴ نشان داده شده است. درصد زنده‌مانی سلول‌ها، نسبت به سلول‌های شاهد در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از نمودارها نشان داد که با افزایش غلظت از صفر به ۵۰ میکرومولار اثرات سیتوتوکسیتی دارو به تدریج افزایش می‌یابد و منجر به مرگ سلولی می‌شود. به طور مثال نسبت زنده‌مانی سلولی در نانوذره PEG دارنده حامل دارو در غلظت ۵۰ میکرومولار، در سه بازه زمانی مذکور برای رده سلولی AGS به ترتیب ۵، ۳۷ و ۱۸٪ و برای رده سلولی MCF-7 به ترتیب ۴۶، ۲۲ و ۱۱٪ است. تیمار



نمودار ۴) آزمون MTT و مقایسه زنده‌مانی رده سلولی MCF-7 (A, C, E) و AGS (B, D, F) در سه بازه ۲۴ (A و B)، ۴۸ (C و D) و ۷۲ ساعته (E و F) با غلظت‌های مختلف نانوذرات آهن پیگیده شده، دوکسوروبیسین و نانوذرات پیگیده شده حامل دوکسوروبیسین؛ (\* $p < 0.05$ ), (\*\* $p < 0.01$ ) و (\*\*\*) $p < 0.001$ )

۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشتر از ۹۵٪ است، در حالی که در غلظت‌های بالاتر (۳۰۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و تیمار ۶ ساعته زنده‌مانی سلول‌ها به ۵۵ تا ۶۵٪ کاهش یافت. نتایج سنجش آپوپتوز و نکروز با روش پروپیدیوم نشان داد که اکثر سلول‌ها با مکانیزم آپوپتوز از بین رفته‌اند، زیرا با افزایش غلظت نانوذرات میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) افزایش پیدا کرده‌اند که خود منجر به آسیب و مرگ سلول می‌شود<sup>[28]</sup>. بررسی خصوصیات نانوذرات حاصل از برهم‌کنش دوکسوروبیسین و کوپلیمر PLA-PEG، نشان داد که نانوذرات حاصل در این روش دارای اندازه ۱۳۰-۱۸۰ نانومتر و بارده انکیسولاسیون ۵۳٪ بودند. همچنین رهاسازی دوکسوروبیسین از نانوذرات PEG-PLA/DOX به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر pH محیط قرار دارد، به‌طوری که با افزایش pH از ۵/۰ به ۷/۴ رهايش دوکسوروبیسین به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. طبق نتایج این مطالعه نانوذرات PEG-PLA/DOX در مقایسه با دوکسوروبیسین فاقد پوشش از سمیت بیشتری در غلظت‌های برابر دوکسوروبیسین برخوردارند که علت این پدیده قابلیت جذب بیشتر دوکسوروبیسین به سلول‌های MCF-7 به دلیل اندازه کمتر در مقایسه با نانوذرات PLA-PEG/DOX است<sup>[29]</sup>. در زمینه سازگارسازی این نانوذرات مغناطیسی می‌توان اصلاح سطح را برگزید، به‌طوری که با استفاده از پوشش‌های سطحی مختلف (پلی‌اتیلن‌گلیکول) خواص زیست‌پزشکی مطلوب و پایداری را برای این ذرات ایجاد کرد و از اثرات پارتنیکوتیک و سمیت نانوذرات مغناطیسی که ناشی از برهم‌کنش‌های آنها با سلول یا پروتئین‌های بیولوژیکی است را ممانعت کرد. نتیجه این عمل افزایش زیست‌سازگاری نانوذرات مغناطیسی خواهد بود. پس از آماده‌سازی نانوذره برای ورود به بدن می‌توان از آن برای حمل ترکیبات مختلف از جمله دارو استفاده کرد. با توجه به این روش ماندگاری دارو روی نانوذره پگیله‌شده افزایش پیدا خواهد کرد<sup>[30]</sup>.

در این مطالعه، تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات تقریباً کروی و اندازه آنها برابر ۱۴-۱۲ نانومتر گزارش شد. در نمودارهای طیف FTIR پیک‌های مربوطه ارتعاشی و خمشی بودن پیوندها را می‌رساند. حضور پوشش PEG در نانوذره، باعث جذب تشعشع توسط هسته مگنتیت شده است. پیک‌های نانوذرات پوشش‌دار شده با PEG، نسبت به نانوذرات مگنتیت خالص ضعیف‌تر و همین‌طور نانوذرات مگنتیت پگیله‌شده همراه دارو به مراتب ضعیف‌تر از هر دوی آنها است که بیانگر بارگیری دارو بین لایه‌های پلی‌اتیلن‌گلیکول اطراف نانوذرات مگنتیت است. در آنالیز XRD هم تشکیل کریستال‌هایی با پیک‌های متفاوت را نشان داد که به عبارتی خاصیت‌های پارامغناطیس نانوذرات را در پیک‌های به‌دست‌آمده بیان می‌کند. همان‌طور که در نتایج دیده شد، در ۲۴ ساعت اول پس از تیمار نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG/DOX با بافر PBS، بخش اعظمی از داروی دوکسوروبیسین بارگذاری‌شده رهاسازی شد. با توجه به اینکه طی فرآیند بارگذاری دوکسوروبیسین توسط نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG، دوکسوروبیسین می‌تواند در قسمت سطحی نانوذرات

روش هم‌رسوبی یک روش ساده و متداول برای سنتز نانوذرات مگنتیت از محلول آبی نمک‌های آن‌ها است. از مزایای این روش می‌توان به استفاده از آب به‌عنوان حلال، بازده و خلوص بالا و سهولت تنظیم شرایط واکنش اشاره کرد<sup>[20, 21]</sup>. گوپتا و ونز با سنتز نانوذرات سوپراپارامغناطیس اکسید آهن و اصلاح سطح آنها توسط پلیمر پلی‌اتیلن‌گلیکول، به بررسی مطالعات فیزیکوشیمیایی نانوذرات از قبیل TEM و AFM پرداختند. طبق نتایج آنها شکل نانوذرات سنتز شده کروی و اندازه آنها حدود ۵۰-۴۰ نانومتر است. همچنین با مطالعه طیف‌های FT-IR و X-ray از لحاظ توانایی ورود نانوذرات اکسید آهن پگیله‌شده به سلول، زیست‌سازگاری آنها را برای استفاده‌های زیست‌پزشکی تعیین کردند<sup>[22]</sup>. انبارسو و همکاران نیز با سنتز نانوذرات اکسید آهن با روش هم‌رسوبی و پوشش‌دهی آنها توسط پلی‌اتیلن‌گلیکول، یافته‌های گوپتا و ونز را ثابت کردند. آنها با استفاده از طیف ارتعاشی مغناطیسی (VSM) رفتار سوپراپارامغناطیس در این نانوذرات را تایید کردند<sup>[23]</sup>. در مطالعه‌ای اثرات سمیت نانوذرات اکسید آهن سه ظرفیتی در غلظت‌های مختلف روی سلول‌های هلا با روش الکتروفورز تک ژلی مورد بررسی قرار گرفت و در غلظت‌های پایین نانوذره (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) هیچ آسیبی در DNA مشاهده نشد<sup>[24]</sup>. در مطالعه دیگری کمترین میزان سمیت در رده سلول‌های پستانداران را بین نانوذرات اکسید آهن فلزی، نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> داشتند<sup>[25]</sup>. جبراه و همکاران، تحقیقی در همین راستا روی سلول‌های سرطانی MCF-7 انجام دادند و ضمن سنتز نانوذرات آهن، نشان دادند که این نانوذرات به‌تنهایی نمی‌توانند رشد سلول‌های MCF-7 را مهار کنند. آنها پس از بارگیری داروی انتخابی و با قراردادن سلول‌ها در یک میدان مغناطیسی استاتیک، در غلظت‌های مختلف (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۵ میکرومولار) آزمون MTT را انجام دادند که طی این آزمون مشخص شد با افزایش غلظت از میزان بقای سلول‌ها کاسته می‌شود. همچنین با بررسی سمیت داروی خالص و داروی بارگیری‌شده به نانوذرات مغناطیسی نتیجه گرفتند که اثر سیتوتوکسیته داروی بارگیری‌شده بیشتر از فرم آزاد آن است<sup>[26]</sup>. شوئیگر و همکاران، نانوذرات مگنتیت اکسید آهن سنتز شده به روش هم‌رسوبی را با پلی‌اتیلن‌آمین، پلی‌اتیلن‌گلیکول و پلی‌اتیلن‌آمین منشعب تثبیت کردند و اثر سمیت سلولی پلیمر پوشش‌دهنده نانوذرات مگنتیت اکسید آهن را روی سلول‌های اپی‌تلیالی آدنوکارسینوما ریوی A549 مورد بررسی قرار دادند که نشان داد ترکیب پلی‌اتیلن‌آمین و نانوذرات اکسید آهن در مقایسه با پلیمر پلی‌اتیلن‌آمین سمیت سلولی چشمگیری را ایجاد می‌کند<sup>[27]</sup>. ناکوی و همکاران، مطالعه‌ای را در رابطه با سنتز نانوذرات اکسید آهن و اصلاح سطح آنها با تویین ۸۰ و بررسی سمیت سلولی آن با سنجش MTT منتشر کردند. اهداف آنها، بررسی تاثیر پارامترهای زمان و غلظت بر پتانسیل سمیت سلولی نانوذرات بود. نتایج تست MTT نشان می‌دهد که بقای سلول‌های J774 بعد از تیمار ۳ ساعته و در غلظت‌های ۲۵ تا



- 2- Moore KL, Dalley AF, Agur AM. Clinically oriented anatomy. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
- 3- Wiechmann L, Kuerer HM. The molecular journey from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. *Cancer*. 2008;112(10):2130-42.
- 4- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
- 5- Arora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;315(3):971-9.
- 6- Haghirsadat F, Amoabediny G, Sheikha MH, Zandieh-doulabi B, Naderinezhad S, Helder MN, et al. New liposomal doxorubicin nanoformulation for osteosarcoma: Drug release kinetic study based on thermo and pH sensitivity. *Chem Biol Drug Des*. 2017;90(3):368-79.
- 7- Ariga K, Lvov YM, Kawakami K, Ji Q, Hill JP. Layer-by-layer self-assembled shells for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(9):762-71.
- 8- Kim JE, Shin JY, Cho MH. Magnetic nanoparticles: An update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Arch Toxicol*. 2012;86(5):685-700.
- 9- Bakhtyari Z, Saei AA, Hajipour MJ, Raoufi M, Vermesh O, Mahmoudi M. Targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for early detection of cancer: Possibilities and challenges. *Nanomedicine*. 2016;12(2):287-307.
- 10- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol Rev*. 2001;53(2):283-318.
- 11- Veisheh O, Gunn JW, Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(3):284-304.
- 12- Gautier J, Allard-Vannier E, Munnier E, Soucé M, Chourpa I. Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles. *J Control Release*. 2013;169(1-2):48-61.
- 13- Munnier E, Cohen-Jonathan S, Hervé K, Linassier C, Soucé M, Dubois P, et al. Doxorubicin delivered to MCF-7 cancer cells by superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Effects on subcellular distribution and cytotoxicity. *J Nanoparticle Res*. 2011;13(3):959-71.
- 14- Babaei E, Sadeghizadeh M, Hassan ZM, Feizi MA, Najafi F, Hashemi SM. Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Int Immunopharmacol*. 2012;12(1):226-34.
- 15- Azar NT, Mutlu P, Khodadust R, Gunduz U. Poly (amidoamine) (PAMAM) nanoparticles: Synthesis and biomedical applications. *J Biol Chem*. 2013;41(3):289-99.
- 16- Unsoy G, Gunduz U. Targeted drug delivery via chitosan-coated magnetic nanoparticles. In: Andronescu E, Grumezescu AM, editors. *Nanostructures drug delivery*. Amsterdam: Elsevier; 2017. pp. 835-64.
- 17- Veronese FM, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today*. 2005;10(21):1451-8.
- 18- Kojima Ch, Regino C, Umeda Y, Kobayashi H, Kono K. Influence of dendrimer generation and polyethylene glycol length on the biodistribution of PEGylated dendrimers. *Int J Pharm*. 2010;383(1-2):293-6.
- 19- Luo D, Haverstick K, Belcheva N, Han E, Mark Saltzman W. Poly (ethylene glycol)-conjugated PAMAM dendrimer for biocompatible, high-efficiency DNA delivery. *Macromolecules*. 2002;35(9):3456-62.

یا بخش درون آن بارگذاری شود، به نظر می‌رسد علت رهایش زیاد در زمان اولیه مربوطه به دوکسوروبیسین متصل شده به قسمت سطحی PEG باشد. این در حالی بود که در مدت زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت سرعت رهایش دوکسوروبیسین به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. از دلایل کاهش سرعت رهایش دارو دوکسوروبیسین پس از مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت شاید بتوان به تداخل زنجیره PEG در رهایش دوکسوروبیسین اشاره کرد. نتایج سمیت سلولی نانوذرات نشان داد که تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعته نانوذرات فاقد پوشش و پوشش‌دار، اثر سمی روی سلول‌های سرطانی ندارند و سلول‌ها از لحاظ شکل ظاهری و مورفولوژی تغییری از خود نشان ندادند، در حالی که در همین بازه زمانی، تیمار سلول‌ها توسط نانوذرات بارگیری شده با دارو فعالیت بسیار موثری بر مهبس سلول MCF-7 و AGS نسبت به حالت آزاد دارو نشان داد. با افزایش غلظت از صفر به ۵۰ میکرومولار اثرات سیتوتوکسیتی دارو به تدریج افزایش یافت و منجر به مرگ سلولی شد.

### نتیجه‌گیری

حضور پلی‌اتیلن‌گلیکول در سطح نانوذرات مگنتیت موجب افزایش نیمه عمر گردش داروی دوکسوروبیسین می‌شود و اثر سمیت روی رده‌های سلول‌های سرطانی MCF-7 و AGS وابسته به غلظت و زمان است. همچنین این پوشش، پایداری و زیست‌سازگاری نانوذرات را احتمالاً می‌تواند افزایش دهد و به دلیل خاصیت هیدروفیلی خود، با جذب مولکول‌های آب به اطراف خود از تجمع نانوذرات و لخته شدن ممانعت می‌کند. با بهبود ویژگی‌های زیست‌شناختی و فارماکولوژیکی به نظر می‌رسد که نانوذرات مگنتیت پگیله شده کاندیدایی نویدبخش برای دارورسانی هدفمند باشند.

**تشکر و قدردانی:** مطالعه حاضر مربوط به پایان‌نامه کارشناسی ارشد است. نویسندگان از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل به دلیل فراهم کردن امکانات و نیز از تمام کسانی که در انجام این مطالعه همکاری و حمایت کردند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

**تاییدیه اخلاقی:** موردی توسط نویسندگان گزارش نشد.

**تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** شیدا جهازی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ هاشم یعقوبی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ حسین اکبری (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری (۲۰٪)

**منابع مالی:** مطالعه حاضر بدون حمایت مالی انجام شده است.

### منابع

- 1- Sadjadi A, Nouraei M, Mohagheghi MA, Mousavi-Jarrahi A, Malekezadeh R, Parkin DM. Cancer occurrence in Iran in 2002, an international perspective. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2005;6(3):359-63.



- 25- Jeng HA, Swanson J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2006;41(12):2699-711.
- 26- Aljarrah K, Mhaidat NM, Al-Akhras MA, Aldaher AN, Albiss BA, Aledealat K, et al. Magnetic nanoparticles sensitize MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *World J Surg Oncol.* 2012;10(1):62.
- 27- Schweiger C, Pietzonka C, Heverhagen J, Kissel T. Novel magnetic iron oxide nanoparticles coated with poly (ethylene imine)-g-poly (ethylene glycol) for potential biomedical application: Synthesis, stability, cytotoxicity and MR imaging. *Int J Pharm.* 2011;408(1-2):130-7.
- 28- Naqvi S, Samim M, Abdin MZ, Ahmed FJ, Maitra A, Prashant CK, et al. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *Int J Nanomed.* 2010;5:983-9.
- 29- Ayen WY, Garkhal K, Kumar N. Doxorubicin-loaded (PEG) 3-PLA nanopolymerosomes: Effect of solvents and process parameters on formulation development and in vitro study. *Mol Pharm.* 2011;8(2):466-78.
- 30- Shen L, Li B, Qiao Y. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in targeted drug/gene delivery systems. *Materials.* 2018,11(2):324.
- 20- Sun J, Zhou Sh, Hou P, Yang Y, Weng J, Li X, et al. Synthesis and characterization of biocompatible Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *J Biomed Mater.* 2007;80(2):333-41.
- 21- Iida H, Takayanagi K, Nakanishi T, Osaka T. Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with various sizes and magnetic properties by controlled hydrolysis. *J Coll Interface Sci.* 2007;314(1):274-80.
- 22- Gupta AK, Wells S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2004;3(1):66-73.
- 23- Anbarasu M, Anandan M, Chinnasamy E, Gopinath V, Balamurugan K. Synthesis and characterization of polyethylene glycol (PEG) coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles by chemical co-precipitation method for biomedical applications. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2015;135:536-9.
- 24- Cheng W, Huang S, Wei C, Zeng Q, Hu C, Du J, et al. Cytotoxicity effects of nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> on HeLa cells. *International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2010 June 18-20, Chengdu, China. Piscataway: IEEE; 2010.*