Đánh giá độc tính và khả năng tăng tín hiệu tương phản ảnh MRI của vật liệu nano từ Fe₃O₄@PLA-PEG trên mô hình in vitro

Nguyễn Đắc Tú^{1, 2*}, Hà Phương Thu³, Bùi Thị Vân Khánh¹, Phạm Hồng Nam³, Nguyễn Xuân Phúc³, Lâm Khánh⁴, Hoàng Thị Mỹ Nhung¹

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội ²Trung tâm Công nghệ cao Vinmec ³Viện Khoa học Vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam ⁴Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Ngày nhận bài 12/4/2021; ngày chuyển phản biện 16/4/2021; ngày nhận phản biện 28/5/2021; ngày chấp nhận đăng 4/6/2021

<u>Tóm tắt:</u>

Hạt nano lõi sắt từ (superparamagnetic iron oxide nanoparticles - SPIONs) được cấu tạo từ lõi Fe_3O_4 hoặc gamma Fe_2O_3 và vỏ bọc tương hợp sinh học như Dextran, Poly Lactic Acid (PLA), Poly Ethylene Glycol (PEG), Chistosan hay Poly Vinyl Alcohol (PVA). SPIONs có nhiều ứng dụng quan trọng trong y sinh học như phân tách tế bào, mang thuốc, nhiệt từ trị, làm tác nhân tương phản cho cộng hưởng từ hạt nhân. Hệ nano lõi sắt từ Fe_3O_4 được bọc bởi copolyme PLA-PEG (Fe_3O_4 @PLA-PEG) cho thấy không có độc tính trên hai dòng tế bào BT-474 và Sarcoma 180. Đánh giá trên chế độ chụp T2 cho thấy hệ nano Fe_3O_4 @PLA-PEG có khả năng làm tăng tương phản ảnh chụp MRI trong nhiều điều kiện khác nhau, bao gồm môi trường nước, môi trường chứa dung dịch ly giải tế bào và cả khi bị thực bào. Kết quả nghiên cứu thể hiện tiềm năng ứng dụng của hệ nano từ Fe_3O_4 @PLA-PEG trong tăng tương phản hình ảnh MRI phục vụ cho các chẩn đoán lâm sàng.

Từ khóa: ảnh cộng hưởng từ, độc tính tế bào, hạt nano thuận từ, PLA-PEG.

Chỉ số phân loại: 1.7

Đặt vấn đề

Hạt nano (nanoparticles) được định nghĩa là vật liệu với cả ba chiều đều có kích thước nanomet (1-100 nm). Trong đó, hạt nano lõi sắt từ hay lõi oxit sắt siêu thuận từ superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) là loại hạt nano thuận từ duy nhất đã được chấp thuận sử dụng trong lâm sàng [1, 2]. SPIONs được cấu tạo từ lõi (Fe₃O₄ hoặc gamma Fe₂O₃) và vỏ bọc tương hợp sinh học có bản chất vô cơ hoặc hữu cơ, độc tính thấp và dược động học đã được nghiên cứu rõ ràng [3, 4]. Vỏ bọc đóng vai trò quan trọng trong khả năng duy trì từ tính, sự ổn định, phân tán của hạt nano, tính tương hợp sinh học cũng như được động học của toàn hệ trong cơ thể. Chiến lược hiện đang được quan tâm trong việc bọc các hạt nano sắt từ là sử dụng các polymer, đáng chú ý nhất là Dextran, PLA, PEG, Chistosan, PVA [4, 5].

SPIONs được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực của y học lâm sàng, sinh học như phân tách tế bào, mang thuốc hướng đích, tăng tương phản trong chụp ảnh cộng hưởng từ (Magnetic resonance imaging - MRI), nhiệt trị liệu (Hyperthermia) [3-8]. Trong những ứng dụng nêu trên, tăng tương phản ảnh chụp cộng hưởng từ là hướng đi rất đáng quan tâm trong chẩn đoán ung thư. Dựa trên đặc tính hưởng ứng với từ trường của SPIONs, phương pháp chụp cộng

*Tác giả liên hệ: Email: v.tund5@vinmec.com

hưởng sử dụng hạt nano từ làm tăng tín hiệu hình ảnh, từ đó giúp đánh giá chính xác vị trí, tình trạng của mô bệnh lý, bao gồm cả khối u [9-12]. Hiện nay, Nhiều SPIONs đã được phê duyệt để thương mại hóa, ứng dụng trong trong chẩn đoán lâm sàng, trong đó đáng chú ý có thể kể đến Ferumoxides (Feridex® IV, Berlex Laboratories), Ferucarbotran (Resovist®, Bayer Healthcare), Ferumoxtran-10 (AMI-227, Code-7227) [13, 14].

Những nghiên cứu ngày càng nhiều về độc tính trong ứng dụng của SPIONs cũng làm gia tăng những lo ngại về độc tính, ảnh hưởng lâu dài của loại vật liệu này với cơ thể con người. Từ kích thước nanomet và các đặc tính riêng, SPIONs có thể gây ra nhiều ảnh hưởng đến sức khỏe con người [15-17]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung đánh giá độc tính in vitro của SPIONs được nghiên cứu chế tạo trong nước cũng như nghiên cứu thử nghiệm của loại vật liệu này với vai trò làm tác nhân tăng tín hiệu hiện ảnh cộng hưởng từ hạt nhân.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu

Vật liệu nano $\text{Fe}_{3}\text{O}_{4}$ @PLA-PEG nồng độ lõi sắt từ 5 mg/ml. Phương pháp chế tạo và các đặc tính của hệ nano $\text{Fe}_{3}\text{O}_{4}$ @PLA-PEG được báo cáo chi tiết tại [18]. Các đặc

Evaluation of cytotoxicity and MRI contrast enhancement ability of Fe₃O₄@PLA-PEG iron oxide nanoparticles in vitro model

Dac Tu Nguyen^{1, 2*}, Phuong Thu Ha³, Thi Van Khanh Bui¹, Hong Nam Pham³, Xuan Phuc Nguyen³, Khanh Lam⁴, Thi My Nhung Hoang¹

¹Department of Biology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi ²Vinmec Hi-Tech Center ³Institute of Materials Science, Vietnam Academy of Science and Technology ⁴108 Military Central Hospital

Received 12 April 2021; accepted 4 June 2021

<u>Abstract:</u>

SPIONs are composed of Fe₃O₄ or gamma Fe₅O₃ cores and a biocompatible shell from Dextran, PLA, PEG, Chitosan, or PVA. SPIONs have many important applications in medicine and biology such as cell sorting, drug carrier, magnetic hyperthermia, and magnetic resonance imaging (MRI). This study aims to check the ability of copolymer PLA-PEG coated Fe₂O₄ ferromagnetic nanosystems (Fe₂O₄@PLA-PEG) produced for MRI application. The results showed that these nanoparticles had non-toxicity on BT-474 and Sarcoma 180 cell lines. Evaluation on T2 imaging mode revealed that Fe₂O₄@PLA-PEG nanoparticles were capable of enhancing the MRI image contrast in different conditions, including water, cell lysates solution, and even inside the cells. The report demonstrates that Fe₃O₄@PLA-PEG nanoparticles have a high potential application in MRI for clinical diagnosis.

Keywords: cytotoxicity, MRI, PLA-PEG, SPIONs.

Classification number: 1.7

tính cơ bản của hệ nano Fe₃O₄@PLA-PEG: hình dạng cầu với một lõi duy nhất, đường kính trung bình 20 nm (trong đó lõi Fe₃O₄ là 15 nm), tỷ lệ PLA-PEG:Fe₃O₄ là 0,3:3 mg/ ml. Vật liệu Fe₃O₄@PLA-PEG có khả năng duy trì ổn định trong dung dịch tối thiểu 90 ngày.

Nuôi cấy tế bào

Dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến vú người BT-474 và ung thư mô liên kết chuột Sarcoma 180 (American Type Culture Collection) được nuôi cấy lần lượt trong môi trường DMEM và RPMI 1640 (Gibco), 10% FBS (Gibco), 1% kháng sinh (Invitrogen), 5% CO₂.

Thử nghiệm độc tính in vitro (MTT assay)

Bộ kit MTT assay (PROMEGA) được sử dụng để đánh giá độc tính của hệ nano Fe₃O₄@PLA-PEG lên dòng tế bào BT-474 và Sarcoma 180. Tế bào được nuôi cấy ổn định trên đĩa 96 giếng với mật độ 2000 tế bào/giếng trong 24h trước khi bổ sung các chất thử nghiệm theo dải nồng độ của Fe₃O₄ là 500 - 50 - 5 - 0,5 - 0,05 μ g/ml. Sau 48h, đĩa thử nghiệm sẽ được đo bằng máy đo quang phổ huỳnh quang Laminator. Giá trị IC₅₀ được tính theo hướng dẫn của bộ kit.

Phân lập đại thực bào

Chuột nhất trắng Swiss trọng lượng 35-40 g cung cấp bởi Trung tâm Giống động vật chuẩn thức, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương được sử dụng để phân lập đại thực bào. Tế bào sau khi phân lập được nuôi cấy ổn định trong môi trường DMEM 10% FBS, 1% kháng sinh 24h trước khi thực hiện các thử nghiệm. Tế bào đại thực bào được nhuộm kiểm tra bằng kháng thể kháng CD11b chuột gắn huỳnh quang FITC (Abcam). Nhân tế bào được nhuộm bằng Hoechst 33342 (Invitrogen). Mẫu sau xử lý được phân tích bằng hệ thống kính hiển vi đồng tụ laser quét LSM 510 (Carl ziess) và hệ thống đếm tế bào dòng chảy FASC Canto II (Beckman Dicktons).

Chụp ảnh cộng hưởng từ hạt nhân (MRI)

Khả năng tăng tương phản ảnh MRI của hệ nano $\text{Fe}_{3}O_{4}@$ PLA-PEG được kiểm tra ở ba trạng thái: (1) trong môi trường nước, (2) trong môi trường ly giải tế bào Sarcoma 80, và (3) khi bị thực bào. Kỹ thuật chụp ảnh MRI được tiến hành trên máy chụp cộng hưởng từ 3T (Phillipe). Các mẫu được phân tích trên chế độ chụp T2, TE 80 ms, TR 3,0 s.

Cường độ tín hiệu ảnh MRI sau chụp được chuyển đổi sang giá trị pixel bằng phần mềm Image J. Dữ liệu được phân tích bằng t-test Student trên phần mềm Graph Prism 9.1.0 (221). Ý nghĩa thống kê được xác định với p<0,05.

Kết quả

Độc tính in vitro của hệ nano từ

Khả năng tăng sinh của hai dòng tế bào BT-474 và Sarcoma 180 ở nồng độ thử nghiệm cao nhất của Fe_3O_4 @ PLA-PEG đều đạt trên 80%, ở 3 nồng độ trung gian đạt 90-95% và ở nồng độ thấp nhất không có sự khác biệt so với đối chứng sinh học (hình 1) (p>0,05). Kết quả thử nghiệm cho thấy hệ nano Fe_3O_4 @PLA-PEG ở dải nồng độ thử nghiệm không gây độc cho tế bào. Giá trị IC₅₀ thu được lớn hơn 500 µM.





Hình 1. Tỷ lệ tăng sinh của tế bào Sarcoma 180 và BT-474 so với đối chứng sinh học khi được thử nghiệm độc tính với hệ nano $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ PLA-PEG theo dải nồng độ 0,05-500 µM.

Phân lập và định danh đại thực bào

Quần thể tế bào thu từ xoang bụng chuột được quan sát dưới kính hiển vi quang học ngay sau khi phân lập gồm các tế bào dạng cầu, trôi nổi, kích thước không đồng nhất (hình 2A). Sau 24h nuôi cấy, đa số các tế bào bám dính, một số hình thành các chân giả đặc trưng cho kiểu hình của tế bào thực bào với kích thước khoảng 10-15 μ m (hình 2B). Kết quả phân tích trên kính hiển vi đồng tụ laser quét LSM 510 (Carl Ziess) cho thấy hầu hết các tế bào đều biểu hiện dương tính với chỉ thị sinh học CD11b gắn FITC có màu xanh lá (hình 2C) và có nhân dạng hạt đậu đặc trưng cho các tế bào đại thực bào (hình 2D). Thống kê trên phần mềm FACS DIVA của hệ thống FACS Canto II thể hiện 97% tế bào bám dính sau 24h nuôi cấy dương tính với CD11b, tương đương với tỷ lệ đại thực bào thu được (hình 2F).



Hình 2. Tế bào đại thực bào tách từ xoang bụng chuột nhất trắng Swiss. Tế bào ngay sau khi phân lập (A) và bám dính sau 24h nuôi cấy (B). (A, B) = 20 µm. Các tế bào dương tính với chỉ thị đặc hiệu của đại thực bào CD11b gắn huỳnh quang FITC màu xanh lá (C) và có nhân hình hạt đậu màu xanh lam (D). (D) = 10 µm. Tỷ lệ đại thực bào có trong quần thể sau nuôi cấy chiếm 97% (F). Đối chứng không nhuộm huỳnh quang (E).

Khả năng tăng tín hiệu hình ảnh chụp MRI của vật liệu nano Fe₂O₄@PLA-PEG

Tín hiệu chụp MRI của vật liệu Fe₂O @PLA-PEG trong môi trường ly giải tế bào Sarcoma 180: môi trường bên trong cơ thể có thể ảnh hưởng đến tín hiệu MRI của các vật liêu. Chính vì vây, chúng tôi thực hiện kiểm tra mức độ ảnh hưởng của các phân tử trong môi trường dịch cơ thể lên khả năng tăng tương phản trong chụp MRI của hệ Fe₂O₄@PLA-PEG. Kết quả cho thấy, môi trường có chứa dung dịch ly giải tế bào không làm ảnh hưởng đến tính chất tương phản ảnh của hệ nano. Chế độ chup T2 vẫn cho sư khác biệt manh về tín hiệu giữa đối chứng không có nano Fe₂O₄@PLA-PEG (giếng 6) và các giếng có chứa-nano Fe₂O₄@PLA-PEG (hình 3B). Ngay ở nồng độ 250 µM (giếng 2), sự khác biệt về tín hiệu tối trên màn hình đã rất rõ ràng so với đối chứng (giếng 6) (p<0,05). Từ nồng độ 1000 μ M (giếng 4), tín hiệu tối màu gần như chiếm toàn bộ diện tích ảnh. Nếu so sánh các giếng có cùng nồng đô vật liệu, có thể nhân thấy tín hiệu tối màu trên các giếng tương ứng trộn lẫn dung dịch ly giải tế bào (hình 3B) mạnh hơn so với trong môi trường chỉ có nước (hình 3A) (p<0,05). Kết quả thu được tượng ứng với giá trị đo được trên Image J (bảng 1).



Hình 3. Kết quả chụp MRI. Kết quả chụp trên chế độ T2 của vật liệu Fe₃O₄@PLA-PEG trong (A) môi trường nước, (B) môi trường dung dịch ly giải tế bào Sarcoma 180 và (C) trong điều kiện bị thực bào với các nồng độ vật liệu như sau: (1) 50 μ M, (2) 250 μ M, (3) 500 μ M, (4) 1000 μ M, (5) 2500 μ M, (6) Đối chứng không có vật liệu.

Bảng 1. Kết quả đo tín hiệu sáng màu (pixel) trên ảnh MRI của vật liệu Fe₃O₄@PLA-PEG bằng phần mềm Image J.

Nồng độ vật liệu (µM)	Giá trị cường độ sáng (pixel)		
	Môi trường nước	Môi trường ly giải tế bào	Khi bị thực bào
50	171,3±8,5	169,5±9,6	109,5±7,7*
250	168,5±9,2	121,8±9,4*	14,3±0,6*
500	76,3±6,7*	66,1±5,3*	11,5±0,5*
1000	35,5±2,3*	22,9±1,5*	8,3±0,3*
2500	18,7±1,1*	10,2±0,3*	9,5±0,2*
Đối chứng	179,6±11,8	175,8±10,5	183,1±10,9

^{*}p<0,05

Tín hiệu chụp MRI của vật liệu Fe_3O_4 @PLA-PEG sau khi bị thực bào: sau 24 giờ bổ sung vật liệu Fe_3O_4 @PLA-PEG vào môi trường nuôi cấy, có thể quan sát thấy những biến đổi rõ rệt của đại thực bào. Tế bào có màu nâu đỏ do đã thực bào vật liệu nano vào trong tế bào chất, kích thước tế bào tăng lên, hình thành nhiều không bào, số lượng chân giả giảm, tế bào có xu hướng co tròn (hình 4).



Hình 4. Hình ảnh trường sáng và hiển vi điện tử (TEM) của đại thực bào trước và sau khi thực bào vật liệu nano Fe_3O_4 @PLA-PEG. Tế bào đại thực bào trước khi ủ với hạt nano từ Fe_3O_4 @PLA-PEG ở chế độ chụp trường sáng (A) và TEM (B). Tế bào đại thực bào sau khi ủ với hạt nano từ Fe_3O_4 @PLA-PEG ở chế độ chụp trường sáng (C) và TEM (D). Tế bào đại thực bào sau khi ủ với hạt nano từ Fe_3O_4 @PLA-PEG ở chế độ chụp trường sáng (C) và TEM (D). Tế bào đại thực bào sau khi ủ với hạt nano từ Fe_3O_4 @PLA-PEG ở chế độ chụp trường sáng (E) và TEM (F) với độ phóng đại lớn.

Kết quả thử nghiệm cũng cho thấy hệ nano $\text{Fe}_{3}O_{4}@$ PLA-PEG sau khi bị thực bào vẫn có khả năng tăng cường tín hiệu chụp MRI. Ngay tại nồng độ vật liệu ủ với đại thực bào thấp nhất 50 µM (giếng 1), tín hiệu MRI đã mạnh hơn so với đối chứng (hình 3C) (p<0,05). Tín hiệu MRI gần như đạt tối đa tại nồng độ 250 µM (giếng 2) (hình 3C). Như vậy, trong điều kiện bị thực bào, khả năng tăng tương phản hình ảnh MRI trên chế độ chụp T2 của vật liệu Fe₃O₄@PLA-PEG mạnh hơn so với ở trạng thái trong nước và trong môi trường ly giải tế bào. Kết quả thu được tương ứng với giá trị đo được trên Image J (bảng 1).

Bàn luận

Độc tính in vitro của hệ nano Fe_3O_4 @PLA-PEG sử dụng trong nghiên cứu có giá trị IC₅₀ lớn hơn nhiều lần so với liều thử nghiệm cao nhất 500 µM. Theo Boyd, một chất được coi là có độc tính nếu giá trị IC₅₀ nhỏ hơn 100 µM [19]. Như vậy có thể nói hệ vật liệu nano Fe₃O₄@PLA-PEG trong nghiên cứu không có hoạt tính gây độc tế bào. Kết quả này tương đồng với công bố của Domaca và cộng sự trên vật liệu nano từ bọc PLA-PEG với IC₅₀ là 37, 26, và 23 nM khi tiếp xúc 24, 48 và 72h trên dòng tế bào A549 [20] và có độc tính thấp hơn nhiều so với công bố của Kazem và cộng sự là 27,5 và 1 μ g/ml (tương đương 137,5 và 5 μ M) trên dòng tế bào NIH3T3 và A549 [21].

Vật liệu nano với lõi sắt từ Fe_3O_4 là các chất siêu thuận từ. Chúng sẽ tác động trực tiếp làm giảm thời gian hồi phục

T2 [22], từ đó tăng độ tương phản của hình ảnh trong chế độ chup T2. Kết quả thu được khi tiến hành chup MRI với hệ nano từ Fe₃O₄@PLA-PEG hoàn toàn tuân theo lý thuyết trên. Hệ nano Fe₂O₄@PLA-PEG gây ra sư nhiễu loạn từ trường địa phương tại vị trí mà nó tập trung do sự tương tác giữa momen từ của các proton trong nguyên tử hydro của nước và momen từ của lõi Fe₂O₄ trong quá trình hồi phục. Sự nhiễu loạn từ trường nêu trên làm tín hiệu trên hình ảnh có màu tối hơn các vùng xung quanh [23-25]. Nguyên nhân của hiện tượng tín hiệu MRI trong môi trường ly giải tế bào manh hơn môi trường nước liên quan đến sự có mặt của protein và lipit. Những phân tử này thường có nhiều điểm tích điện trên bề mặt và có khuynh hướng hút các proton mang điện tích dương. Chúng tao thành các cầu nối lỏng lẻo làm giảm bớt khả năng chuyển đông tự do của các phân tử nước. Phần nước bị hạn chế chuyển động như vậy được gọi là nước tù. Các phân tử trong nước tù chuyển động

chậm nên các proton của chúng dễ bị tác động bởi tình trạng không đồng nhất của từ trường cục bộ xung quanh, thời gian hồi giãn T2 ngắn, hiển thị trên hình ảnh màu tối hơn.

Bạch cầu đơn nhân sau khi được hình thành ở tủy xương sẽ theo dòng máu di cư vào trong mô để biệt hóa tao thành đại thực bào. Trong quần thể đại thực bào, nhóm M2 là các đại thực bào liên kết ung thư đóng vai trò quan trọng trong việc làm diu phản ứng viêm, loại bỏ sản phẩm thải của tế bào, kích thích sự tạo mạch và tái tổ chức mô, từ đó kích thích khối u phát triển. Bằng nhiều cách khác nhau, khối u có xu hướng lôi kéo các đại thực bào này về phía nó [26, 27]. Đặc điểm này gọi ý phương thức hướng đích trong đó các đại thực bào được sử dụng như phương tiện để vận chuyển hạt nano tập trung vào vị trí khối u, phục vụ cho các mục đích dẫn thuốc hay chụp MRI. Tính chất tăng tương phản hình ảnh MRI của vật liệu nano khi bị thực bào mạnh hơn so với ở trạng thái thường là kết quả phù hợp do vật liệu nano từ khi bị thực bào sẽ được chứa trong không bào hoặc lysosome. Trong môi trường này, lượng nước tư do rất ít, trong khi nồng độ hạt nano từ lại cao nên cả thời gian hồi giãn T2 được rút ngắn và làm tăng tín hiệu màu tối.

Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy hệ nano Fe₃O₄@PLA-PEG không có độc tính với hai dòng tế bào BT-474 và Sarcoma 180. Đồng thời, hệ vật liệu sử dụng trong nghiên cứu có tín hiệu tốt trên chế độ chụp T2 trong môi trường nước, môi trường lẫn tế bào và khi bị thực bào nên có tiềm năng ứng dụng cao trong hỗ trợ tăng tính tương phản hình ảnh chụp MRI. Ngoài ra, các đại thực bào có thể được sử dụng như một tác nhân vận chuyển tiềm năng để đưa vật liệu nano đến vị trí khối u, từ đó phục vụ cho các ứng dụng chẩn đoán bằng chụp cộng hưởng từ hay mang thuốc hướng đích.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Peter Reimer, Thomas Balzer (2003), "Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications", *European Radiology*, **13**, pp.1266-1276.

[2] Yi Xiang, J. Wang (2015), "Current status of superparamagnetic iron oxide contrast agents for liver magnetic resonance imaging", *World Journal of Gastroenterology*, **21(47)**, pp.13400-13402.

[3] Burghard Thiesen, Andreas Jordan (2007), "Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia", *International Journal of Hyperthermia*, **12**, pp.467-474.

[4] Joanna Dulin'ska-Litewka, Agnieszka Łazarczyk, Przemysław Hałubiec, Oskar Szafran'ski, Karolina Karnas and Anna Karewicz (2019), "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles - current and prospective medical applications", *Journal of Materials*, **12(4)**, pp.617.

[5] P. Sangaiya & R. Jayaprakash (2018), "A review on iron oxide nanoparticles and their biomedical applications", *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, **31**, pp.3397-3413.

[6] G.F. Goya, V. Grazú, M.R. Ibarra (2008), "Magnetic nanoparticles for cancer therapy", *Current Nanoscience*, **4**, pp.1-16.

[7] W.C. Zamboni (2008), "Concept and clinical evaluation of carrier-mediated anticancer agents", *The Oncologist*, **13**, pp.248-260.

[8] D.B. Fenske (2008), "Liposomal nanomedicines: an emerging field", *Toxicologic Pathology*, **36**(1), pp.21-29.

[9] R. Jurgons, C. Seliger, A. Hilpert, L. Trahms, S. Odenbach and C. Alexiou (2006), "Drug loaded magnetic nanoparticles for cancer therapy", *Condensed Matter.*, **18**, pp.2893-2902.

[10] Burghard Thiesen & Andreas Jordan (2008), "Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia", *International Journal* of Hyperthermia, **24(6)**, pp.467-474.

[11] P.W. Goodwill, E.U. Saritas, L.R. Croft, T.N. Kim, K.M. Krishnan, D.V. Schaffer (2012), "Magnetic nanoparticles for safe medical imaging", *X-Space MPI*, **24**, pp.3870-3877.

[12] P. Fortina, L.J. Kricka, D.J. Graves, J. Park, T. Hyslop, F. Tam, N. Halas, S. Surrey, S.A. Waldman (2007), "Applications of nanoparticles to diagnostics and therapeutics in colorectal cancer", *Trends Biotechnol.*, **25**, pp.145-152.

[13] I. Hilger, W.A. Kaiser (2012), "Iron-oxide based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia", *Nanomedicine*, **7(9)**, pp.1443-1451. [14] Koichiro Hayashi, Michihiro Nakamura, Wataru Sakamoto, Toshinobu Yogo, Hirokazu Miki, Shuji Ozaki, Masahiro Abe, Toshio Matsumoto, and Kazunori Ishimura (2013), "Superparamagnetic nanoparticle clusters for cancer theranostics combining magnetic resonance imaging and hyperthermia treatment", *The Theranostics*, **3(6)**, pp.366-376.

[15] G. Oberdörster, V. Stone, K. Donaldson (2007), "Toxicology of nanoparticles: a historical perspective", *Journal of Nanotoxicology*, 1(1), pp.2-25.

[16] Nemi Malhotra, Jiann-Shing Lee, D. Rhenz Alfred Liman, S. Johnsy Margotte Ruallo, B. Oliver Villaflores, Tzong Rong Ger, and Chung Der Hsiao (2020), "Potential toxicity of iron oxide magnetic nanoparticles: a review", *Journal of Molecules*, **25**(14), pp.3159.

[17] H. Markides, Rotherham, A.J. El Haj (2012), "Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine", *Journal* of Nanomaterials, **13**, pp.1-13.

[18] Q.T. Phan, P.T. Ha, T.T.H. Le, H.N. Luu, X.P. Nguyen (2016), "Structure and properties of Fe_3O_4 nanoparticles coated by PLA-PEG copolymer with and without loading of curcumin", *Journal of Science and Technology*, **54**, pp.268-276.

[19] Micheal Boyd (2004), "The NCI human tumor cell line (60-Cell) screen", *Anticancer Drug Development Guide*, **6**, pp.41-61.

[20] B.H. Domaca, S. AlKhatibb, O. Zirhliac, N.G. Akdogand, S.C. Ocal Diricane, G. Bulutf, O. Akdogan (2020), "Effects of pegylated Fe-Fe₃O₄ core-shell nanoparticles on NIH3T3 and A549 cell lines", *Journal of Heliyon*, **6(1)**, DOI: 10.1061/j.heliyon.2019.e03124.

[21] Kazem Nejati-Koshki, Mehran Mesgari, Eommolbanin Ebrahimi, Farhad Abbasalizadeh, Sedigeh Fekri Aval, Amir Ahmad Khandaghi, Mozhgan Abasi, Abolfazl Akbarzadeh (2014), "Synthesis and in vitro study of cisplatin-loaded Fe₃O₄ nanoparticles modified with PL-GA-PEG₆₀₀₀ copolymers in treatment of lung cancer", *Journal of Microencapsul*, **31(8)**, pp.815-823.

[22] A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Fahling, F. Roland (1999), "Magnetic fluid hyperthermia (MFH): cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **201(3)**, pp.413-419.

[23] Hou Dong Zuo, Wei Wu Yao, Tian Wu Chen, Jiang Zhu, Juan Juan Zhang, Yu Pu, Gang Liu, and Xiao Ming Zhang (2014), "The effect of superparamagnetic iron oxide with iRGD peptide on the labeling of pancreatic cancer cells in vitro: a preliminary study", *Biomed Research International*, DOI: 10.1155/2014/852352.

[24] P. Reimer, T. Balzer (2002), "Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast - enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications", *European Radiology*, **13(6)**, pp.1266-1276.

[25] Somayeh Sadighian, Maryam Khalkhali, Kobra Rostamizadeh, Farhad Khoeini, Mehran Naghibi and Mehrdad Hamidi (2015), "The impact of polymer coatings on magnetite nanoparticles performance as MRI contrast agents: a comparative study", *Journal of Pharmaceutical Scienc*es, **45**, DOI: 10.1186/s40199-015-0124-7.

[26] Hrystella Lamagna, Michel Aurrand - Lions, Beat A. Imhof (2006), "Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis", *Journal of Leukocyte Biology*, DOI: 10.1189/jlb.1105656.

[27] Kindt, Goldsby, Osborne (2004), "Mononuclear phagocytes", *Kuby Immunology*, **6**, pp.36-37.

