



Diatom Biosilica Shell Manipulation with Gold, SPION Nanoparticles and Trastuzumab with Aims of Diagnostics of HER2 Cells

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Esfandiyari J.¹ PhD,
Shojaedin-Givi B.¹ PhD,
Mozafari-Nia M.² MSc,
Hashemzadeh H.¹ PhD,
Naderi-Manesh H.^{*1} PhD

How to cite this article

Esfandiyari J, Shojaedin-Givi B, Mozafari-Nia M, Hashemzadeh H, Naderi-Manesh H. Diatom Biosilica Shell Manipulation with Gold, SPION Nanoparticles and Trastuzumab with Aims of Diagnostics of HER2 Cells. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):581-588.

¹Nanobiotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Analytical Chemistry Department, Basic Sciences Faculty, Persian Gulf University, Bushehr, Iran

*Correspondence

Address: Sciences Faculty, University of Guilan, Namjoo Street, Rasht, Iran.
Postal Code: 4193833697
Phone: +98 (21) 82884410
Fax: +98 (21) 82884410
naderman@modares.ac.ir

Article History

Received: March 4, 2019

Accepted: July 14, 2019

ePublished: December 21, 2019

ABSTRACT

Diatoms biosilica shell, frustule, is substitute biostructures to mesoporous silica particles, which possesses their wide surfaces, nano-diameter porosity, mechanical strength, and thermal stability, optical capabilities, and the ability to bind to biomolecules can be used in biosensing applications. In this study, diatom species called *Chaetoceros muelleri*, was used for the fabrication of the Fe₂O₃-Au-Biosilica magnetic package. After micro-algae cultivation, the synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) on silica walls was carried out using the bio-synthesis method which evaluations have demonstrated the continuous formation of spherical AuNPs on the walls and its surfaces. After this step, the magnetic iron oxide nanoparticles were attached to the silica surface of the diatom, this, in turn, leads to system guiding using a magnetic field. Surface modification of diatoms magnetic complex, by using the APTES, allowed the attachment of fluorescence Rhodamine and the Herceptin antibody (Trastuzumab) to the structure. As well as the attachment of the fabricated system to target cells (SKBR3) was confirmed by fluorescence microscopic analysis. The results of this study indicate the ability and specificity of the diatom silicone shell as a “multipurpose” package for diagnostic and therapeutic activities.

Keywords Diatom; Biosynthesis; Nanoparticles; Cancer; Biosensor

CITATION LINKS

[1] Carbon nanotubes: Materials for medicinal chemistry and biotechnological applications [2] The glass menagerie: Diatoms for novel applications in nanotechnology [3] Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism [4] Mesoporous MCM-41 as drug host system [5] Nanostructured mesoporous silicas for bone tissue regeneration [6] Bone-regenerative bioceramic implants with drug and protein controlled delivery capability [7] Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells [8] Porous silica microshells from diatoms as biocarrier for drug delivery applications [9] Diatom morphogenesis: Natural fractal fabrication of a complex microstructure [10] Past, present and future of diatoms in biosensing [11] Enhancing surface plasmon resonances of metallic nanoparticles by diatom biosilica. Opt Express [12] Biosynthesis of silicon-germanium oxide nanocomposites by the marine diatom *Nitzschia frustulum* [13] Biological fabrication of photoluminescent nanocomb structures by metabolic incorporation of germanium into the biosilica of the diatom *Nitzschia frustulum* [14] Metabolic insertion of nanostructured TiO₂ into the patterned biosilica of the diatom *Pinnularia* sp [15] Modification of the physical and optical properties of the frustule of the diatom *Coscinodiscus wailesii* by nickel sulfate [16] Biosynthesis of gold nanoparticles using diatoms-silica-gold and EPS-gold bionanocomposite formation [17] Biosynthesis of gold nanoparticles by the living freshwater diatom *Eolimna minima*, a species developed in river biofilms [18] Surface-enhanced Raman spectroscopy sensors from nanobiosilica with self-assembled plasmonic nanoparticles [19] Graphene oxide decorated diatom silica particles as new nano-hybrids: Towards smart natural drug microcarriers [20] Iron oxide nanoparticle encapsulated diatoms for magnetic delivery of small molecules to tumors [21] Silica microcapsules from diatoms as new carrier for delivery of therapeutics [22] Tailoring morphological and interfacial properties of diatom silica microparticles for drug delivery applications [23] Exploitation of diatom frustules for nanotechnology: Tethering active biomolecules [24] Photoluminescence detection of biomolecules by antibody-functionalized diatom biosilica [25] Folate conjugated fluorescent silica nanoparticles for labeling neoplastic cells [26] A novel fluorescent label based on organic dye-doped silica nanoparticles for HepG liver cancer cell recognition

دست‌ورزی پوسته سیلیکایی گونه‌ای از دیاتوم‌های دریایی با نانوذرات طلا، اکسید آهن و تراستوزومب با هدف شناسایی سلول‌های واجد گیرنده HER2

جاوید اسفندیاری PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

بهناز شجاع‌الدین‌گیوی PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

محمد مظفری‌نیا MSc

گروه شیمی تجزیه، دانشکده علوم پایه، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

هادی هاشم‌زاده PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

حسین نادری‌منش* PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

پوسته سیلیکایی دیاتوم‌ها، ساختارهایی زیستی و جایگزین برای ذرات سیلیکایی مزوپورس مصنوعی هستند که به علت داشتن سطوح گسترده، منافذ دقیق نانومتری، زیست‌سازگاری، پایداری مکانیکی و حرارتی، قابلیت‌های نوری و امکان اتصال به بیومولکول‌ها، قابلیت‌های ممتازی برای طراحی بیوسنسورها دارند. در این مطالعه دیاتوم *Chaetoceros sp.* برای ساخت بسته‌های مغناطیسی Fe_2O_3 -Au-Biosilica مورد استفاده قرار گرفت. پس از کشت ریزجلبک‌ها، سنتز نانوذرات طلا در دیواره سیلیکایی با روش سنتز زیستی صورت گرفت که ارزیابی‌ها بیانگر سنتز نانوذرات کروی طلا به صورت پیوسته روی سطوح و منافذ دیواره بود. پس از این مرحله نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن نیز به سطح سیلیکایی دیاتوم متصل و از این طریق امکان هدایت سامانه سیلیکایی با استفاده از میدان مغناطیسی فراهم شد. اصلاح سطح این بسته‌های مغناطیسی دیاتوم با استفاده از ترکیب APTES امکان اتصال رنگ فلورسنت رودامین و آنتی‌بادی هرسپتین (Trastuzumab) به این ساختار را فراهم کرد. همچنین موفقیت اتصال سامانه به سلول‌های هدف (SKBR3) با تصاویر میکروسکوپ فلورسنت مورد تایید قرار گرفت. نتایج این مطالعه بیانگر قابلیت ویژه پوسته سیلیکایی این دیاتوم به عنوان یک بسته "چندمنظوره" در فعالیت‌های تشخیصی و درمانی است.

کلیدواژه‌ها: دیاتوم، سنتز زیستی، نانوذرات، سرطان، بیوسنسور

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۲۳

* نویسنده مسئول: naderman@modares.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر، طراحی ساختارهایی به منظور انتقال دارو به بافت هدف (به عنوان مثال به تومور) و به حداقل رساندن اثرات جانبی ناخواسته روی بافت‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است [1, 2]. در همین راستا استفاده از ذرات متخلخل سیلیکایی به عنوان یکی از گزینه‌های ساخت سامانه‌های انتقال دارو، مورد توجه بوده است. این ذرات سیلیکایی با درجه تخلخل متفاوت (میکرو، مزو، ماکرو) و مقیاس‌های مختلف (نانو و میکرومتر) سنتز و در جهت انتقال هدفمند دارو به منظور برطرف کردن مشکلات متداول انتقال دارو مانند محدودیت حلالیت و پایداری، نیز به منظور افزایش نرخ

آزادسازی طولانی مدت دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند [3, 4]. از جمله ذرات سیلیکایی که بدین منظور مورد استفاده قرار گرفته‌اند می‌توان به مزوپورس سیلیکایی مانند MCM-41 و SBA-15 اشاره داشت [5, 6]. اگرچه ساختارهای مزوپورس در اندازه و مورفولوژی‌های مختلف سنتز می‌شوند و ویژگی‌های آنها را می‌توان برای کاربردهای متفاوت تغییر داد اما به دلیل محدودیت‌هایی از جمله سمی بودن مواد مورد نیاز برای سنتز، زمان‌بر بودن و پرهزینه بودن فرآیند سنتز، استفاده از ساختارهای جایگزین که چنین محدودیت‌هایی نداشته باشد، مورد توجه قرار گرفتند [7]. از جمله مواد جایگزین برای سیلیکاهای سنتزی، ساختارهای سیلیکایی طبیعی هستند که در اسکلت خارجی گروهی از جلبک‌ها با نام "دیاتوم‌ها" یافت می‌شوند. ساختارهای سیلیکایی دیاتوم‌ها به دلیل حفره‌های منظم طبیعی و پایداری بالا توجه زیادی را در زمینه انتقال دارو به خود جلب کرده‌اند [8]. دیاتوم‌ها، تک‌سلولی، فتوسنتزکننده و دارای یک پوسته اسکلتی از سیلیکای آمورف (SiO_2) هستند که به صورت انکپسوله شده در یک دیواره سیلیکایی خاص با نام "فروستول" قرار گرفته‌اند. فروستول‌ها واجد منافذی با طراحی‌های میکرو و نانومتری هستند. این ساختارهای متخلخل نانومتری، واجد تنوع بی‌نظیری به مراتب فراتر از تکنیک‌های فعلی ساخت ابزارهای میکرومتری و نانومتری هستند [9]. ویژگی بارز بیوسیلیکای دیاتوم، نظم سلسله‌مراتبی با الگوی سه‌بعدی منافذ آن است که در اندازه‌های با ابعاد ۲۰ نانومتر تا ۲ میکرون دیده می‌شوند، این ساختارها از ناحیه سطحی گسترده و پایداری مکانیکی بالایی برخوردار هستند [10]. ویژگی‌های منحصر به فرد دیاتوم‌ها و قابلیت استفاده از آنها در زمینه نانوتکنولوژی باعث ایجاد یک زمینه مطالعاتی بین رشته‌ای به نام "دیاتوم نانوتکنولوژی" در سال ۱۹۸۸ شده است [9]. فروستول‌های دیاتوم، ساختمان‌هایی فوتونیک ارزان و بیولوژیک با مورفولوژی‌های متنوع هستند که واجد پتانسیل‌هایی برای کاربرد در سلول‌های خورشیدی، غشاهای انتخابی، بیوسنسورهای مبتنی بر فوتولومینسنس، سیستم‌های انتقال دارو، ابزارهای الکترولومینسنس/فوتولومینسنس هستند [11].

در این مطالعه، با تمرکز روی یک گونه دیاتومی با نام *Chaetoceros sp.* راهکارهای دست‌ورزی و استفاده از آن به عنوان یک مدل از دیاتوم نانوتکنولوژی با هدف امکان استفاده از آن در کاربردهای تشخیصی و درمانی مورد بررسی قرار گرفته است و در این راستا سعی شده است از روش‌های سنتز زیستی و دوست‌دار محیط زیست استفاده شود.

مواد و روش‌ها

مواد مصرفی: مواد مورد استفاده شامل تولوئن، ۲-پروپانول، سولفات روی، مس (ii) سولفات ۵آبه، کلرید آهن ۶آبه، دی‌سدیم دی‌آمین تترا استیک اسید، سدیم‌دی‌هیدروژن فسفات، سدیم‌نیترات، تولوئن ۲- پروپانول آهن (II) سولفات، کلرید کبالت ۷آبه، اسید هیدروکلریدریک، سدیم سیلیکات ۹آبه، تیامین

اضافه و نهایتاً تحت دمای 90°C به مدت ۶ ساعت تحت هم‌زدن مداوم انکوبه شد. پس از اتمام فرآیند پوسته‌های سیلیکایی به دست آمده با سانتریفیوژ جمع‌آوری و چند بار شست‌وشو داده و محصول در 10°mL آب مقطر حل شد.

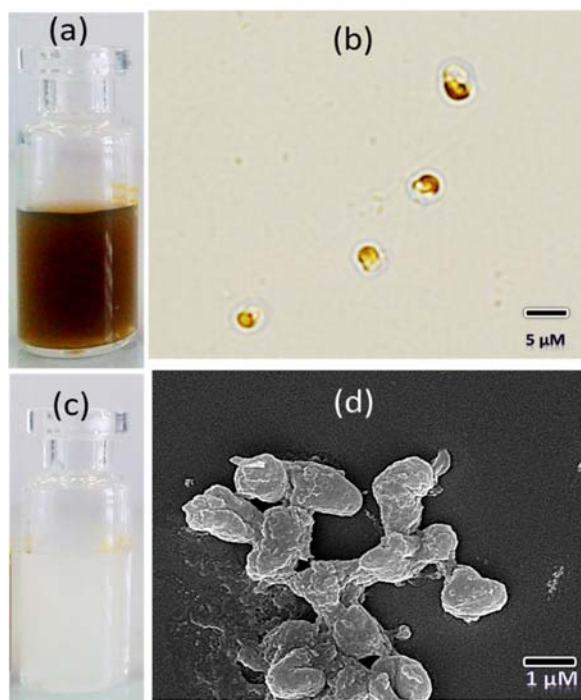
ساخت نانوذرات مغناطیسی و اتصال آن به دیاتوم: ساخت نانوذرات مغناطیسی با روش احیای شیمیایی صورت گرفت. برای سنتز نانوذره مغناطیسی ابتدا محلول‌های جداگانه آهن (III) کلرید 28°mL ، آهن (II) سولفات 64°mL در حجم 5°mL لیتر ساخته و تحت گاز نیتروژن و هم‌زدن شدید، محلول هیدروکسید سدیم یک مولار به عنوان احیاکننده به میزان 25°mL لیتر با استفاده از دکانتر به آن اضافه شد. هنگامی که محلول از حالت سبزرنگ به حالت سیاه‌رنگ تغییر حالت داد، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون واجد نانوذرات مغناطیسی برداشته شد (معادل 100°mL گرم ذرات مغناطیسی اکسید آهن) و پس از ته‌نشین‌سازی ذرات مغناطیسی با استفاده از یک مگنت در زیر ظرف نمونه، نانوذرات مغناطیسی آهن چند بار با آب مقطر شست‌وشو داده شدند و با کنترل pH محیط روی ۶، با هم‌زدن دوباره به حالت معلق درآمدند. برای ساخت فروستول‌های مغناطیسی شده و با هدف درگیرکردن سطوح دیاتوم با نانوذرات مغناطیسی، 10°mL لیتر از ذرات دیاتوم سنتز شده در مرحله قبل (معادل یک گرم) با یک میلی‌لیتر از نانوذرات مغناطیسی (معادل 100°mL گرم) مخلوط شد. برای اتصال دیاتوم‌های پاک‌سازی شده با نانوذرات مغناطیسی، با کنترل دما در 50°C ، میزان pH برابر ۶ و هم‌زدن مداوم (مکانیکی) و انکوباسیون شبانه، شرایط محیطی مورد نیاز برای اتصال ذرات مغناطیسی به دیواره سیلیکایی دیاتوم فراهم شد.

اصلاح سطح دیاتوم با اتصال آنتی‌بادی هرسپتین و رنگ فلورسنت رودامین: برای تولید ذرات سیلیکایی هدفمند، یک میلی‌لیتر از دیاتوم‌های مغناطیسی شده با 30°mL لیتر تولوئن مخلوط و سپس 300°mL میکرولیتر آب استریل به آنها اضافه شد و به مدت ۲ ساعت تحت شرایط هم‌زدن مکانیکی قرار گرفت. پس از آن $1/7^{\circ}\text{mL}$ لیتر APTES به آن اضافه و به مدت ۶ ساعت در دمای 60°C انکوبه شد. در آخر نمونه‌ها با کمک سانتریفیوژ جمع‌آوری و به ترتیب با تولوئن، ۲-پروپانول و آب دوبار مقطر شست‌وشو داده شد. اتصال آنتی‌بادی به 10°mL لیتر از سوسپانسیون دیاتوم (یک گرم) با استفاده از مخلوط کردن دیاتوم‌ها با مقادیر 2°mL از دو ماده NHS و EDC به همراه یک میلی‌گرم آنتی‌بادی هرسپتین (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، در حضور بافر PBS و تحت دمای محیط و انکوباسیون ۴ ساعته و سپس سه بار شست‌وشوی نمونه صورت گرفت. برای اتصال رودامین به دیاتوم مغناطیسی شده، 10°mL لیتر از محصول مرحله قبل با 50°mL میکرولیتر رنگ رودامین 6G با غلظت 10°mL مخلوط و در دمای محیط به مدت ۵ ساعت انکوبه شد. پس از آن با استفاده از یک مگنت ذرات مغناطیسی که با رودامین رنگ شده بودند در ته تیوب جمع‌آوری و رنگ‌های اضافی با یک سمپلر حذف شدند. مراحل شست‌وشو با آب مقطر و سپس جداسازی چند بار

اسید هیدروکلریک، ویتامین B12، بیوتین، سدیم مولیبدات دی‌هیدرات، کلرید منگنز 4°mL ، HAuCl_4 آبه (مرک؛ آلمان) خریداری شدند. رنگ فلورسنت رودامین 6G، ان-هیدروکسی سوکسینیمید (NHS)، ۱- (۳-دی‌متیل آمینو پروپیل)-۳-اتیل کربودیامید هیدروکلراید (DEC) تهیه شدند (سیگما، ایالات متحده). آنتی‌بادی هرسپتین (آریوژن زیست‌دارو؛ ایران) نیز به کار رفت. گونه دیاتوم با نام *Chaetoceros sp.* از بانک ریزجلیک‌های پارک علم و فناوری خلیج فارس با کد ABC-24 تامین و لاین‌های سلولی SKBR3 و MDA (انستیتو پاستور؛ تهران؛ ایران) خریداری شدند.

کشت جلبک و تولید بیوسیلیکا از ذرات دیاتوم: سوش جلبکی خالص دیاتوم با نام *Chaetoceros sp.* برای این تحقیق استفاده شد. برای رشد جلبک از ترکیبات معدنی سدیم نیترات، کلرید آهن 6°mL ، مس (II) سولفات 5°mL ، سولفات روی 7°mL ، کلرید کبالت 6°mL ، کلرید منگنز 4°mL ، سدیم مولیبدات دی‌هیدرات، بیوتین، ویتامین B12، سدیم سیلیکات 9°mL ، تیامین اسید هیدروکلریک طبق فرمول محیط کشت گیلارد (F/2) به منظور غنی‌سازی آب دریای رقیق شده (شوری ۳۵ppt) استفاده شد. به منظور جلوگیری از رشد ارگانیسم‌های ناخواسته، محیط‌های کشت مایع پس از ساخته شدن به مدت یک ساعت در دمای 12°C و فشار 30°atm استریل شدند. کشت اولیه ریزجلبک در فلاسک‌های 250°mL لیتری، در دمای 30°C و تحت نور 2000°lux با دوره نوری "روشنایی: تاریکی ۸:۱۶" صورت گرفت. برای به دست آوردن بیومس، از ظروف کشت استریل 10°L لیتری تحت همان شرایط به همراه هوادهی ملایم با پمپ هوا استفاده شد. به منظور رشد جلبک‌ها، محیط‌های کشت با میزان مناسب از استوک جلبک (۱۰٪ حجم محیط) تلقیح و به مدت ۱۰ روز در شرایط تعریف شده نگهداری شدند.

بیوسنتز نانوذرات طلا در دیواره دیاتوم: دیاتوم‌های کشت شده پس از تکمیل رشد و وارد شدن به فاز ایستا (در روز هشتم کشت) مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور حذف ترکیبات یونی محیط کشت، ابتدا جلبک‌ها سانتریفیوژ و سپس با هم‌زدن دوباره در آب مقطر معلق شدند. محلول یون‌های طلا در غلظت‌های مختلف صفر تا $1/5^{\circ}\text{mL}$ مولار از یون‌های طلا (Au^{3+}) شامل غلظت‌هایی با مقادیر (صفر، 25°mL ، 50°mL ، 100°mL ، 200°mL ، 300°mL ، 400°mL ، 500°mL ، 1000°mL) و $1/500^{\circ}\text{mL}$ مولار از یون‌های طلا به پلیت‌های کشت جلبک اضافه شدند. نمونه‌ها تحت نور 2000°lux و دمای محیط به مدت ۳ روز قرار داده شدند. پس از پایان دوره تیمار، نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند (10°min در دور 5000°rpm) و پس از ته‌نشین شدن دیاتوم‌ها طیف جذبی UV-Visible ذرات با دستگاه اسپکتوفتومتر گرفته شد. در مرحله بعد با انتخاب غلظت مناسب یون‌های طلا برای سنتز نانوذرات طلا در دیواره، 250°mL لیتر از دیاتوم با غلظت مناسب از یون‌های طلا تیمار شد و در آخر به منظور حذف بخش‌های سیتوپلاسمی و سایر مواد ارگانیکی سلولی از پوسته، بیومس به دست آمده پس از سانتریفیوژ و شست‌وشو، با آب مقطر به حجم 30°mL لیتر رسانده و سپس 10°mL لیتر آب اکسیژنه به ترکیب



شکل ۱ (a) جلبک *Cheatocercus* sp. پس از رشد در محیط کشت، (b) تصویر میکروسکوپ نوری از دیاتوم، (c) پوسته‌های دیاتوم پس از پاکسازی، (d) تصویر SEM از پوسته سیلیکایی *Cheatocercus* sp.

بیوسنتز نانوذرات طلا در دیواره دیاتوم: بررسی جذب نوری نمونه‌ها در سه روز اول تیمار دیاتوم‌ها با غلظت‌های مختلف یون‌های طلا انجام شد که بیانگر تغییر رنگ محیط و کاهش شدت پیک جذبی (اثر هیپوکرومیک) به‌ویژه در دو محدوده جذبی ۴۰۰-۵۰۰ نانومتر و ۶۵۰-۷۰۰ نانومتر و نیز بروز پیک جذبی به مرور در ناحیه ۵۳۰ نانومتر بود (شکل ۲- b)، ده نمونه جلبک با غلظت‌های مختلف از یون‌های طلا، در شروع آزمایش همگی به رنگ قهوه‌ای روشن (رنگ معمول دیاتوم‌های زنده) دیده می‌شدند. در پایان آزمایش (پایان روز سوم) همان‌طور که در شکل مشخص است نمونه‌ها به دلیل قرارگرفتن در معرض یون‌های طلا با غلظت‌های مختلف، تغییر رنگ ملموس داشتند که این تغییر رنگ‌ها می‌تواند به دلیل سنتز نانوذرات طلا در غلظت و فرم‌های متفاوت باشد (شکل ۲- c).

همان‌طور که در شکل ۲- e نشان داده شده است نانوذرات طلا با ابعاد ۷۰ تا ۱۰۰ نانومتر روی سطوح دیاتوم سنتز می‌شوند. غلظت‌های مختلف یون‌های طلا منجر به ظهور پیک‌هایی با شدت بیشتر در ناحیه ۵۳۰ نانومتر می‌شود که بیانگر غلظت بالاتر نانوذرات سنتز شده و نیز تغییر فرم ذرات سنتز شده است (شکل ۲- d).

اتصال نانوذرات مغناطیسی به دیاتوم: با انتخاب غلظت ۰/۵ میلی‌مولار از یون‌های طلا در محیط جلبک برای سنتز نانوذرات طلا، تیمار دیاتوم‌ها با یون‌های طلا در مقیاس ۲۵۰ میلی‌لیتر از دیاتوم‌های وارد شده در فاز ایستای رشد (روز هشتم کشت) صورت گرفت و پس از سه روز با استفاده از آب اکسیژنه پاکسازی قسمت‌های سیتوپلاسمی و رنگدانه‌های جلبک صورت گرفت. در مرحله بعد با ساخت نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن، اتصال آنها به

صورت گرفت تا رنگ‌های متصل‌نشده به ذرات دیاتوم کاملاً شسته شوند.

کشت سلول و بررسی اتصال دیاتوم‌های عامل‌دار شده به سلول‌های هدف: در این مطالعه از لاین سلولی SKBR3 به‌عنوان یک لاین سلول سرطانی HER2 مثبت استفاده شد که به علت داشتن گیرنده‌های HER2 روی سطح خود امکان اتصال به آنتی‌بادی‌های هرسپتین مستقر روی دیاتوم‌های مغناطیسی‌شده را دارد. همچنین لاین سلولی MDA به دلیل نداشتن گیرنده‌های HER2 به روی سطح خود، به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. ابتدا سلول‌ها در محیط DMEM و در دمای ۳۷°C و اتمسفر مرطوب واجد ۵% دی‌اکسید کربن رشد داده شد و به‌منظور بررسی اتصال دیاتوم به سلول‌ها، پس از رشد سلول‌ها در یک کشت شبانه، هر دو لاین‌های سلولی MDA و SKBR3 به‌صورت جداگانه به پلیت‌های ۲۴ چاهکی انتقال داده شدند و به چاهک‌ها مقدار ۱۰ میکرولیتر از دیاتوم‌های عامل‌دار شده اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه با میکروسکوپ فلورسنس وضعیت سلول‌ها و اتصال دیاتوم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

دستگاه‌ها و روش‌های ارزیابی تولید سامانه: تصویربرداری از گونه جلبک و لاین سلولی با استفاده از میکروسکوپ نوری/فلورسانس فاز معکوس Olympus IX71 (Olympus Corporation؛ ژاپن) صورت گرفت. به‌منظور بررسی روند سنتز نانوذرات طلا در سلول‌ها، با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری-ماوراء بنفش مدل specord 250 (analytik؛ آلمان) در بازه نوری ۲۴۰-۳۲۰ نانومتر، طیف جذبی نمونه‌ها در پایان روزهای اول، دوم و سوم تیمار و نیز پس از روندهای پاکسازی با آب اکسیژنه اندازه‌گیری شد. اندازه ذرات و پتانسیل زتای نمونه‌ها با استفاده از دستگاه زتاسایزر (شرکت Malvern؛ انگلستان) اندازه‌گیری شد. از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل KYKY-EM3200 (شرکت KYKY؛ چین) برای تهیه تصاویر SEM از ساختار دیاتوم و نانوذرات سنتز شده استفاده شد. آنالیز FTIR با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر FTIR مدل Spectrum 10.5.2 (شرکت PerkinElmer؛ ایالات متحده) به‌منظور بررسی گروه‌های عاملی سطوح نمونه‌ها انجام گرفت.

یافته‌ها

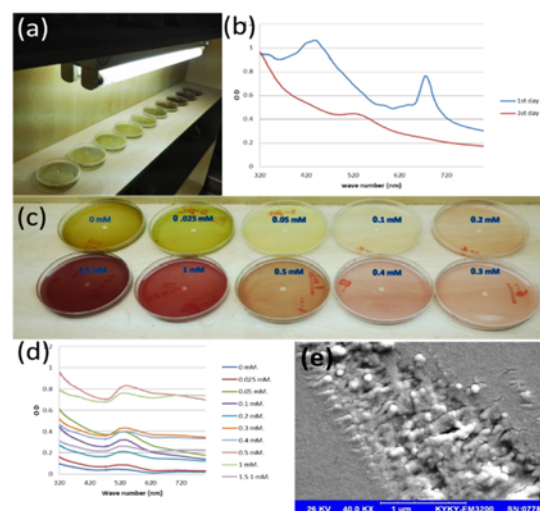
کشت دیاتوم: دیاتوم‌های *Chaetoceros* sp. در محیط کشت گیلارد تحت شرایط نوری ۲۰۰۰ لوکس، دمای ۲۵°C و شوری ۲۵ گرم بر لیتر در مدت هشت روز منجر به تولید یک گرم بر لیتر بر روز بیومس خشک جلبک شد.

مشاهدات میکروسکوپ اینورت بیانگر ساختارهایی نامتقارن و متمایل به بیضی با اندازه متوسط ۳ میکرومتر و به رنگ قهوه‌ای بود (شکل ۱- a و b).

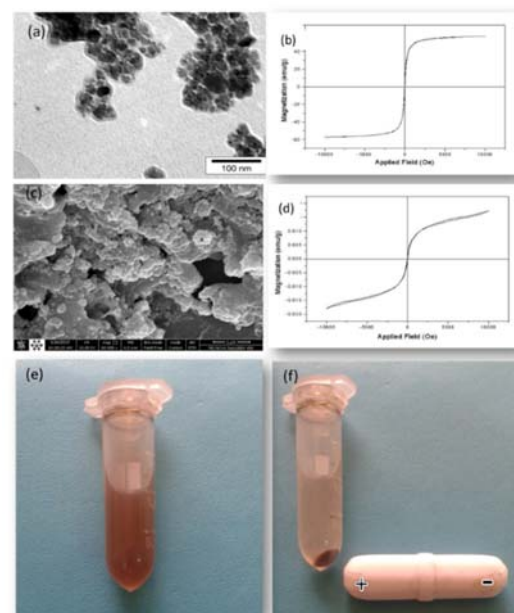
پوسته سیلیکایی این دیاتوم پس از پاکسازی با آب اکسیژنه از قهوه‌ای به رنگ سفید تغییر رنگ می‌دهد و ساختارهایی با ابعاد حدود ۱/۲ میکرومتر با اشکال نامتقارن به وجود می‌آورد که در شکل ۱- d نشان داده شده است.

به منظور تایید اتصال‌ها، طیف IR دیاتوم‌های پاکسازی‌شده، دیاتوم‌های واجد نانوذرات طلا (DIATOM-Au) و دیاتوم‌های واجد نانوذرات طلا و آهن (DIATOM-AU-Fe₂O₃) مورد بررسی قرار گرفت برای این منظور طیف‌های FTIR سه نمونه شامل پوسته سیلیکایی دیاتوم (D)، پوسته سیلیکایی دیاتوم واجد نانوذرات طلا (DA)، پوسته سیلیکایی واجد نانوذرات طلا و آهن (DAF) گرفته شد. همان‌طور که در نمودار ۱ مشخص است در طیف مربوط به پوسته سیلیکایی دیاتوم (D) ما شاهد پیک‌هایی مربوط به گروه‌های عاملی هیدروکسیل و گروه‌های عاملی سیلیکاها هستیم. پیک‌های مشخص در طیف مربوطه بیانگر گروه‌های عاملی Si-O-Si-O-Si و OH در نمونه هستند. در طیف مربوط به DA که مربوط به سنتز زیستی نانوذرات طلا در دیواره سیلیکایی دیاتوم است همان‌طور که مشخص است، پیک‌های جذبی ۲۸۰۰-۳۴۰۰ که مربوط به گروه‌های هیدروکسیل است به دلیل درگیر شدن آنها در اتصال به نانوذرات طلا کاهش یافته‌اند. در طیف DAF که مربوط به مرحله مغناطیسی‌کردن دیاتوم‌های واجد نانوذرات طلا با نانوذرات آهن است ما شاهد تغییراتی جذبی در دو ناحیه هستیم. پیک Si-OH در محدوده ۱۰۰۰-۸۰۰ به علت درگیر شدن در اتصال با نانوذرات آهن ناپدید شده و همچنین شدت پیک‌های مربوط OH در ناحیه ۳۴۰۰-۲۸۰۰ نیز به همین دلیل مجدداً کاهش پیدا کرده است (نمودار ۱).

اتصال تراستوزومب به سطح دیاتوم‌های مغناطیسی‌شده و سپس اتصال رنگ فلورسنس رودامین موجب ایجاد قابلیت اتصال اختصاصی دیاتوم‌های مغناطیسی‌شده و سپس شناسایی آنها از طریق تصویربرداری فلورسنس می‌شود. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود دیاتوم‌های واجد آنتی‌بادی هرسپتین توانایی اتصال به سلول‌های SKBR3 را به دلیل داشتن آنتی‌ژن‌های HER2 روی سطح این سلول‌ها دارند. در نمودار ۱- b نمایی از یک سلول سرطانی که توسط حدود ۱۲ ذره دیاتوم احاطه شده است دیده می‌شود. نور قرمز فلورسنس در اینجا ناشی از اتصال رنگ رودامین به ذرات دیاتوم است که باعث قرمز شدن و شناسایی شدن سلول‌های هدف شده است. سلول‌های MDA برخلاف سلول‌های قبلی فاقد گیرنده HER2 روی سطح خود هستند و در نتیجه امکان اتصال

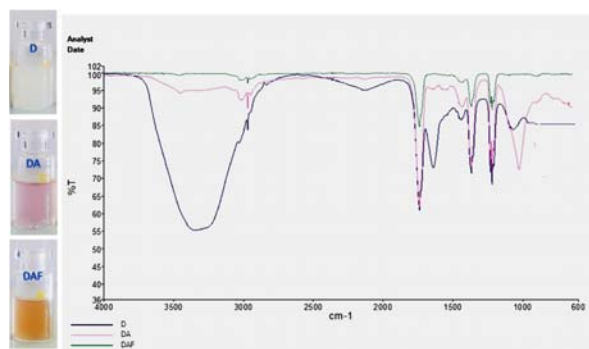


شکل ۲) (a) تیمار دیاتوم‌ها با یون‌های طلا در غلظت‌های مختلف، (b) تغییر طیف جذبی دیاتوم در اثر تیمار با یون‌های طلا (۵/۰ میلی‌مولار) طی سه روز، (c) تغییر رنگ محیط دیاتوم‌ها در اثر تیمار با غلظت‌های مختلف از یون‌های طلا به ترتیب (صفر، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵۰، ۰/۱۰۰، ۰/۲۰۰، ۰/۳۰۰، ۰/۴۰۰، ۰/۵۰۰، ۱/۰۰۰ میلی‌مولار)، (d) تغییرات طیف جذبی پوسته‌های سیلیکایی دیاتوم‌ها تیمار شده با غلظت‌های مختلف یون‌های طلا پس از پاکسازی، (e) تصویر SEM از نانوذرات طلای سنتز شده روی سطوح دیاتوم‌های تیمار شده با ۵/۰ میلی‌مولار از یون‌های طلا

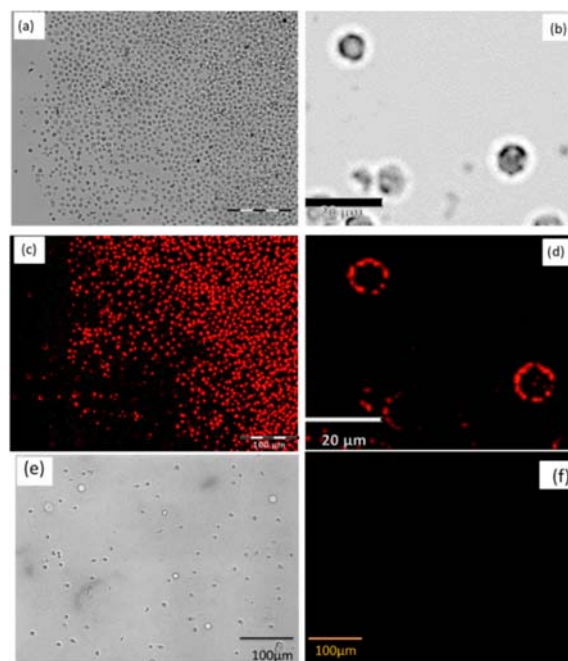


شکل ۳ (a) تصویر TEM از نانوذرات اکسید آهن سنتز شده، **(b)** M-H loop، **(c)** تصویر SEM از دیاتوم‌های مغناطیسی شده با نانوذرات اکسید آهن، **(d)** M-H loop دیاتوم‌های مغناطیسی شده، **(e)** دیاتوم‌های مغناطیسی شده در عدم حضور مگنت، **(f)** تجمع دیاتوم‌های مغناطیسی شده در اثر مجاورت با آهن ربا.

دیاتوم‌های واجد تراستوزومب به آنها و تصویربرداری آنها توسط میکروسکوپ فلورسنس فراهم نمی‌شود.



نمودار ۱) طیف IR ذرات دیاتوم قبل و بعد از اتصال به نانوذرات طلا و اکسید آهن، طیف D (آبی تیره) مربوط به پوسته سیلیکایی دیاتوم، طیف DA (قرمز) مربوط به دیاتوم‌های واجد نانوذرات طلا (DIATOM-Au) و طیف DAF (سبز) مربوط به دیاتوم‌های مغناطیسی (DIATOM-Au-Fe₂O₃)



شکل ۴) (a و b) تصویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های SKBR3 که با سامانه دیاتوم طراحی شده تیمار شده‌اند، (a و b) تصویر میکروسکوپ فلورسنس از همان سلول‌ها (SKBR3) که در اثر تیمار با سامانه دیاتوم واجد نشر فلورسنس قرمز شده‌اند، (e) تصویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های MDA که با سامانه دیاتوم طراحی شده تیمار شده‌اند و (f) تصویر میکروسکوپ فلورسنس از همان سلول‌های MDA که با وجود تیمار با سامانه دیاتوم به دلیل نداشتن گیرنده GER2 امکان جذب و ایجاد نشر فلورسنس قرمز را نداشته‌اند.

بحث

ما در این تحقیق، گونه *Chaetoceros sp.* از دیاتوم‌های دریایی را به عنوان منبع خود تجدید سیلیکایی با اندازه‌هایی بین ۲ تا ۴ میکرون معرفی کردیم که این ساختارهای مزوپورس سیلیکایی، در حضور شرایط و ترکیبات محیط کشت، طی یک دوره رشدی به میزان یک گرم بر لیتر بر روز قابل دستیابی است. این ساختار

سیلیکایی به دلیل داشتن مواد و ترکیبات آلی احیاکننده و زنجیره‌های انتقال الکترون موجود در کلروپلاست، توانایی احیای یون‌های طلای موجود در محیط و سنتز نانوذرات طلا را خواهند داشت. مطالعات مختلف بیانگر اثر ترکیبات محیط کشت روی ویژگی‌های ساختاری و نوری دیاتوم‌ها است برای مثال با اضافه کردن Ge(OH)_4 یا GeO_2 به محیط کشت سنتز نانوساختارهای Si-Ge oxides در فروستول گونه‌ای از دیاتوم‌ها با نام *Nitzschia frustulum* رخ خواهد شد که این فروستول‌های پر شده با ژرمانیوم ویژگی‌های الکترومینیس و فوتولومینیس از خود نشان می‌دهند [12-14]. همچنین حضور NiSO_4 در محیط کشت نیز باعث دوبرابر شدن سایز و منافذ دیاتوم می‌شود و همچنین موجب خاموش شدن فوتولومینیس ذاتی سیلیکای آمورف SiO_2 خواهد شد [15]. مطالعات قبلی نیز نشان داده است که می‌توان با اضافه کردن نمک طلا HAuCl_4 به محیط کشت ریز جلبک‌ها، نانوذرات طلا سنتز کرد [16]. در این مطالعه نیز ما با قراردادن یون‌های طلا در محیط دیاتوم سنتز نانوذرات طلا را انجام دادیم که این نانوذرات طلا به صورت پیوسته با بخش سیلیکایی دیواره سنتز شد. بررسی جذب نوری نمونه‌ها در چهار روز اول تیمار دیاتوم‌ها با یون‌های طلا بیانگر کاهش شدت پیک جذبی (اثر هیپوکرومیک) در دو محدوده جذبی ۴۰۰-۵۰۰ نانومتر و ۶۵۰-۷۰۰ نانومتر بود. این محدوده‌ها مربوط به وجود رنگدانه‌های فتوسنتزی جلبک‌ها (کلروفیل a و b) هستند که در جریان تیمار جلبک با یون‌های طلا به مرور دچار تغییر شده و میزان جذبشان کاهش یافته است. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که نمک طلا متابولیزم درون سلولی را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد و سلول‌های تیمار شده با نمک طلا یک کاهش در میزان فلورسنس کلروفیل را نشان می‌دهند [17]. امکان سنتز نانوذرات طلا در سطح پوسته این دیاتوم بیانگر امکان استفاده از آن در طراحی کاتالیزورها و آنالیزهای متکی بر روش طیف‌سنجی ارتقایافته سطحی رامان (SERS) است که این قابلیت منطبق بر تحقیقات رین و همکاران برای طراحی سنسورهای مبتنی بر SERS با استفاده از دیاتوم بود [18].

افزایش غلظت یون‌های طلا باعث تغییر پیک پلاسمون سطحی مربوط به نانوذرات طلا می‌شود به طریقی که محل پیک‌ها به سمت طول موج‌های بزرگ‌تر تغییر می‌کند و نانوذرات از رنگ قرمز آبیایی به سمت رنگ‌های تیره و بنفش متمایل می‌شوند. همان‌طور که در شکل ۲-d مشخص است باند پلاسmoni در محدوده ۵۳۰ نانومتر مشاهده می‌شود که به دلیل وجود ذرات کلوفیدی طلا با سایزهایی در رنج ۵۰ تا ۸۰ نانومتر است که در تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانوذرات طلای سنتز شده نیز مشاهده می‌شود (شکل ۲-e). با افزایش غلظت یون‌های طلا امکان ایجاد نانوذرات بیشتری از طلا به وجود خواهد آمد ولی با افزایش بیشتر میزان یون‌ها ممکن است اتم‌های طلای اضافی به نانوذرات قبلی اضافه شوند و ذرات بزرگ‌تر و نیز اگریگیت‌ها ایجاد شوند که موجب پهن‌شدگی پیک پلاسمون سطحی و شیف‌ت آن به سمت طول موج‌های بلندتر می‌شود. این

ساختار زیستی سیلیکایی‌ها، از جمله زیست‌سازگاری، پایداری مکانیکی و حرارتی، قابلیت‌های نوری و امکان اتصال ساده به بیومولکول‌ها و آنتی‌بادی‌ها، امکان سنتز انواع نانوذرات در ساختار آن، می‌توان از آن در طراحی کاتالیزورها، بیوسنسورهای تشخیص سلولی و فرایندهای انتقال هدفمند دارو استفاده برد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه قابلیت‌های گونه *Cheatoceruse sp.* به‌عنوان یک گونه دیاتوم بومی خلیج فارس، در سنتز نانوذرات طلا و مغناطیسی‌شدن و همچنین دست‌ورزی‌های شیمیایی آن برای اتصال به آنتی‌بادی و رنگ‌های فلورسانس به اثبات رسید. در این پژوهش نشان داده شد که می‌توان نانو ذرات طلا را با روش کاملاً سبز و سازگار با محیط‌زیست در این دیاتوم سنتز کرد. به‌دلیل قابلیت‌های متنوع ساختار زیستی این دیاتوم‌ها، از جمله زیست سازگاری، پایداری مکانیکی و حرارتی، قابلیت‌های نوری و امکان اتصال ساده به بیومولکول‌ها (آنتی‌بادی‌ها) و همچنین امکان بیوسنتز انواع نانوذرات در دیواره سیلیکایی آن‌ها، می‌توان از پوسته جلبک *Cheatoceruse sp.* در طراحی کاتالیزورها، بیوسنسورهای تشخیص سلولی و فرایندهای انتقال هدفمند دارو استفاده برد.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله نویسندگان کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از سرکار خانم نجمه کازرونی، آقای عباس جمالی و خانم دکتر زهره مرادی که در اجرای این طرح همکاری و همفکری نمودند اعلام می‌دارند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: جاوید اسفندیاری (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۵٪)؛ بهناز شجاع‌الدین‌گیوی (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ محمد مظفری‌نیا (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ هادی هاشم‌زاده (نویسنده چهارم)، نگارنده مقدمه (۱۰٪)؛ حسین نادری‌منش (نویسنده پنجم)، روش‌شناس (۱۵٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر با حمایت‌های مالی خانه نخبگان علمی بسیج شهید مهدوی استان بوشهر، مرکز رشد علم و فناوری خلیج فارس و دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

- 1- Pagona G, Tagmatarchis N. Carbon nanotubes: Materials for medicinal chemistry and biotechnological applications. Curr Med Chem. 2006;13(15):1789-98.
- 2- Gordon R, Losic D, Tiffany MA, Nagy SS, Sterrenburg FAS. The glass menagerie: Diatoms for novel applications in nanotechnology. Trends Biotechnol. 2009;27(2):116-27.
- 3- Kresge CT, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a

اتفاق می‌تواند مربوط به این نکته باشد که ذرات طلا در حفرات سطحی دیاتوم بزرگ‌تر و کشیده‌تر شده‌اند.

مغناطیسی‌کردن دیاتوم واجد نانوذرات طلا با نانوذرات اکسید آهن در این مطالعه با موفقیت صورت گرفت و موجب ایجاد قابلیت جابه‌جایی این دیاتوم‌ها در میدان مغناطیسی شد. سایر مطالعات قبلی نیز نشان داده بود که می‌توان سطح دیاتوم‌ها را با نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 اصلاح کرد، البته در آن مطالعه، گروه‌های دوپا (DOPA) اصلاح‌شده با نانوذرات مغناطیسی از طریق اینترکشن‌های الکترواستاتیک به سطوح دیاتوم متصل می‌شود^[19].

کاربرد دیاتوم‌های عامل‌دارشده با نانوذرات مغناطیسی به‌عنوان یک حامل انتقال دارو تحت هدایت مغناطیسی از طریق لودکردن دارو درون یک گونه دیگر از دیاتوم‌ها و سپس پایداری رهاسازی تا بیش از دو هفته در یک مطالعه صورت گرفت، است^[20]. استفاده از بیوسیلیکای دیاتوم‌ها به‌عنوان جایگزین مواد سیلیکای سنتزی با هدف استفاده به‌عنوان حامل زیستی در انتقال دارو در سایر مطالعات نیز به اثبات رسیده و بیانگر قابلیت دیاتوم‌ها برای این منظور است^[9, 21]. به‌دلیل قابلیت‌های ویژه دیواره سیلیکایی، گروه‌های عاملی شیمیایی اجازه اتصال دارو و رهایش آن را برای دیاتوم فراهم می‌کند و به‌دلیل ماهیت این دیواره، امکان تثبیت کووالان مولکول‌های آنتی‌بادی روی بیوسیلیکای دیاتوم‌ها میسر است^[22-24]. به‌منظور اتصال سامانه‌ها به سلول‌های هدف، آنتی‌بادی‌های اولیه یا ثانویه می‌توانند به‌طور کووالان به سطح ساختار متصل شوند تا از این طریق اتصال انتخابی و کارآمد به سلول‌های سرطانی فراهم شود و همچنین لیگاند‌های گیرنده و پپتیدهای شناسایی نیز می‌توانند به‌منظور برجسب‌گذاری پروتئین‌های غشای سلولی به ساختار سیلیکایی متصل شوند^[16, 25, 26].

در این مطالعه امکان رنگ‌آمیزی سلولی و شناسایی آنها با دیاتوم *Cheatoceruse sp.* با موفقیت صورت گرفت. دیاتوم‌های اصلاح‌شده با آنتی‌بادی هرسپتین به‌خوبی توانستند به سلول‌های هدف که واجد آنتی‌ژن HER2 بودند، متصل شوند و به‌دلیل مولکول‌های رودامین در دیاتوم، موجب تشخیص سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس شدند.

اندازه‌گیری قطر هیدرودایمیک ذرات با استفاده از DLS بیانگر این نکته بود که پوسته سیلیکایی این دیاتوم‌ها پس از پاکسازی حدود ۹۰۰ نانومتر است که با استفاده از روش‌های تخریبی مانند سونیکیت کردن امکان شکستن و کاهش اندازه وجود دارد که در این مطالعه دیاتوم‌هایی با اندازه متوسط ۴۵۰ نانومتر سنتز شدند.

در این مطالعه قابلیت‌های این دیاتوم *Cheatoceruse sp.* در سنتز نانوذرات طلا و مغناطیسی‌شدن و اتصال به آنتی‌بادی و رنگ‌های فلورسنس به اثبات رسید. این نشان داد که می‌توان به‌خوبی سنتز نانو ذرات طلا را با روش کاملاً سبز و سازگار با محیط زیست در این دیاتوم انجام داد و آلودگی‌های حاصل از روش‌های شیمیایی را حذف کرد. همچنین به‌دلیل قابلیت‌های متنوع این

properties of the frustule of the diatom *Coscinodiscus wailesii* by nickel sulfate. *Nanotechnology*. 2007;18(29):295101.

16- Schröfel A, Kratošová G, Bohunická M, Dobročka E, Vávra I. Biosynthesis of gold nanoparticles using diatoms-silica-gold and EPS-gold bionanocomposite formation. *J Nanoparticle Res*. 2011;13(8):3207-16.

17- Feurtet-Mazel A, Mornet S, Charron L, Mesmer-Dudons N, Maury-Brachet R, Baudrimont M. Biosynthesis of gold nanoparticles by the living freshwater diatom *Eolimna minima*, a species developed in river biofilms. *Environ Sci Pollut Res*. 2016;23(5):4334-9.

18- Ren F, Campbell J, Rorrer GL, Wang AX. Surface-enhanced Raman spectroscopy sensors from nanobiosilica with self-assembled plasmonic nanoparticles. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. 2014;20(3):127-32.

19- Kumeria T, Bariana M, Altalhi T, Kurkuri M, Gibson CT, Yang W, et al. Graphene oxide decorated diatom silica particles as new nano-hybrids: Towards smart natural drug microcarriers. *J Mater Chem B*. 2013;1(45):6302-11.

20- Todd T, Zhen Z, Tang W, Chen H, Wang G, Chuang YJ, et al. Iron oxide nanoparticle encapsulated diatoms for magnetic delivery of small molecules to tumors. *Nanoscale*. 2014;6(4):2073-6.

21- Aw MS, Simovic S, Addai-Mensah J, Losic D. Silica microcapsules from diatoms as new carrier for delivery of therapeutics. *Nanomedicine*. 2011;6(7):1159-73.

22- Bariana M, Aw MS, Losic D. Tailoring morphological and interfacial properties of diatom silica microparticles for drug delivery applications. *Adv Powder Technol*. 2013;24(4):757-63.

23- Townley HE, Parker AR, White-Cooper H. Exploitation of diatom frustules for nanotechnology: Tethering active biomolecules. *Adv Funct Mater*. 2008;18(2):369-74.

24- Gale DK, Gutu T, Jiao J, Chang CH, Rorrer GL. Photoluminescence detection of biomolecules by antibody-functionalized diatom biosilica. *Adv Funct Mater*. 2009;19(6):926-33.

25- Santra S, Liesenfeld B, Dutta D, Chatel D, Batich CD, Tan W, et al. Folate conjugated fluorescent silica nanoparticles for labeling neoplastic cells. *J Nanosci Nanotechnol*. 2005;5(6):899-904.

26- He X, Duan J, Wang K, Tan W, Lin X, He Ch. A novel fluorescent label based on organic dye-doped silica nanoparticles for HepG liver cancer cell recognition. *J Nanosci Nanotechnol*. 2004;4(6):585-9.

liquid-crystal template mechanism. *Nature*. 1992;359(6397):710-12.

4- Rámila A, Munoz B, Pérez-Pariente J, Vallet-Regí M. Mesoporous MCM-41 as drug host system. *J Sol Gel Sci Technol*. 2003;26(1-3):1199-202.

5- Izquierdo-Barba I, Colilla M, Vallet-Regí M. Nanostructured mesoporous silicas for bone tissue regeneration. *J Nanomater*. 2008;2008:60.

6- Vallet-Regí M, Balas F, Colilla M, Manzano M. Bone-regenerative bioceramic implants with drug and protein controlled delivery capability. *Prog Solid State Chem*. 2008;36(3):163-91.

7- Slowing I, Trewyn BG, Lin VS. Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells. *J Am Chem Soc*. 2006;128(46):14792-3.

8- Aw MS, Simovic S, Yu Y, Addai-Mensah J, Losic D. Porous silica microshells from diatoms as biocarrier for drug delivery applications. *Powder Technol*. 2012;223:52-8.

9- Gordon R, Aguda BD. Diatom morphogenesis: Natural fractal fabrication of a complex microstructure. *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 4-7 November, 1988, New Orleans, USA. Piscataway: IEEE; 1988. pp. 273-4.

10- Leonardo S, Prieto-Simón B, Campàs M. Past, present and future of diatoms in biosensing. *TrAC Trends Anal Chem*. 2016;79:276-85.

11- Ren F, Campbell J, Wang X, Rorrer GL, Wang AX. Enhancing surface plasmon resonances of metallic nanoparticles by diatom biosilica. *Opt Express*. 2013;21(13):15308-13.

12- Rorrer GL, Chang CH, Liu SH, Jeffries C, Jiao J, Hedberg JA. Biosynthesis of silicon-germanium oxide nanocomposites by the marine diatom *Nitzschia frustulum*. *J Nanosci Nanotechnol*. 2005;5(1):41-9.

13- Qin T, Gutu T, Jiao J, Chang CH, Rorrer GL. Biological fabrication of photoluminescent nanocomb structures by metabolic incorporation of germanium into the biosilica of the diatom *Nitzschia frustulum*. *Acs Nano*. 2008;2(6):1296-304.

14- Jeffries C, Gutu T, Jiao J, Rorrer GL. Metabolic insertion of nanostructured TiO₂ into the patterned biosilica of the diatom *Pinnularia* sp. by a two-stage bioreactor cultivation process. *Acs Nano*. 2008;2(10):2103-12.

15- Townley HE, Woon KL, Payne FP, White-Cooper H, Parker AR. Modification of the physical and optical