



## اثر نانوذرات مغناطیسی آهن بر بیان پروتئین P53 در مغز موش‌های نژاد Balb/C به روش

### ایمونوهیستوشیمی

لیدا فرهادی، ویدا حجتی\*، عبدالحسین شیروی

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

\*مسئول مکاتبات: vida.hojati@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲

### چکیده

نانوذرات به دلیل خواص فیزیکوشیمیایی خود به‌عنوان حامل‌های دارویی در درمان سلول‌های سرطانی در محیط‌های زنده استفاده‌های گسترده‌ای دارند. از این نانوذرات می‌توان به منظور دارورسانی هدفمند و موثر به محل عفونت استفاده نمود. نانوذرات مغناطیسی آهن دارای خواص بیولوژیکی فعالی هستند و می‌توانند توسط فاگوسیتوز یا اندوسیتوز وارد سیستم رتیکیولوآندوتلیال شوند یا توسط سلول‌های فاگوسیتیک مانند مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و الیگودندروسیت‌ها گرفته شوند. نانوذرات می‌توانند توسط افزایش استرس اکسیداتیو به سلول آسیب برسانند. پروتئین P53 یک سرکوبگر تومور است و در اغلب سرطان‌های انسانی یا غیرفعال می‌شود یا عملکرد آن مختل می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی اثر نانوذرات اکسید آهن بر روی بیان پروتئین P53 در بافت مغز موش‌های نژاد Balb/C بوده است. به این منظور ۱۵ سر موش سوری نر به سه گروه پنج تایی تقسیم شدند. گروه‌های تیمار ۱ و ۲ به ترتیب به مدت ۸ روز، دوزهای ۱۰۰ و ۳۰۰ ppm نانوذرات مغناطیسی آهن را بطور روزانه و از راه تزریق درون صفاقی دریافت نمودند. پس از اتمام دوره ۸ روزه حیوانات تشریح شده، مغز آنها خارج گردید و تحت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با Avedin قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نانوذرات اکسید آهن با نفوذ به بافت مغز و ایجاد پاسخ التهابی باعث افزایش پروتئین P53 گردیدند و به نظر می‌رسد که نانوذرات اکسید آهن در غلظت‌های بالا تاثیر قابل توجهی بر بیان پروتئین P53 دارند.

کلمات کلیدی: پروتئین P53، نانوذرات مغناطیسی آهن، مغز، ایمونوهیستوشیمی.

### مقدمه

های زنده استفاده‌های گسترده‌ای دارند. این نانوذرات دارای کاربردهای زیست پزشکی زیادی از قبیل بازسازی بافتی، ایمنی‌سنجی، رفع مسمومیت مایعات زیستی، گرمادرمانی سلول‌های سرطانی و غیره می‌باشند. نانوذرات دارای ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی از نظر اندازه، شکل و نسبت بالای سطح به حجم می‌باشند که این صفات کاربرد آنها را در بسیاری از موارد پزشکی و بیولوژیک مناسب ساخته است. اندازه این مواد گاهی کوچک‌تر و یا در حد ساختارهای سلولی، ویروس، پروتئین و یا یک ژن می‌باشد. این مواد پس از تزریق به جانوران به سرعت در

فناوری نانو واژه‌ای است کلی که به تمام فناوری‌های پیشرفته در عرصه کار با مقیاس نانو اطلاق می‌شود. منظور از مقیاس نانو، ابعادی در حدود ۱ تا ۱۰۰ نانومتر (یک میلیاردم متر) می‌باشد. همه‌ی مواد در مقیاس نانو، خواصی متفاوت از خود بروز می‌دهند. مواد مغناطیسی نیز از این قاعده مستثنی نیستند. در واقع خاصیت مغناطیسی از جمله خواصی است که به مقدار بسیار زیادی به اندازه‌ی ذره وابسته است [۵].

نانوذرات به دلیل خواص فیزیکوشیمیایی که دارند به‌عنوان حامل‌های دارویی در درمان سلول‌های سرطانی در محیط-



اکثر اندام‌ها و بافت‌ها توزیع می‌شوند و پدیده‌ی جذب سلولی آنها بسیار شدید می‌باشد [۱۱].

امروزه به منظور کاربرد مفید و موثر نانوذرات در سیستم‌های بیولوژیک، پوشش‌های مختلفی نظیر آلومین، دکستران، پلی‌اتیلن گلايکول، پلی‌اتیلن اکسید و آسپارتیک اسید بر سطح آنها ایجاد می‌گردد. حضور چنین پوشش‌هایی به پایداری نانوذرات در محیط‌های بیولوژیک و گردش خون، توزیع بافتی و همچنین به ورود این سلول‌ها و کاهش اثر سمی آنها کمک می‌کند. پروتئین p53 یک سرکوبگر تومور است و در اغلب سرطان‌های انسانی یا غیرفعال می‌شود یا عملکرد آن مختل می‌شود. همچنین این پروتئین یک نقش حیاتی در جلوگیری از گسترش تومور دارد. آسیب DNA ناشی از کارسینوژن‌ها، سیگنال‌های تکثیری غیرطبیعی، هیپوکسی و از دست دادن چسبندگی سلولی، مهمترین سیگنال‌ها برای فعال شدن ژن p53 است. با توجه عملکرد مهم و حساس این پروتئین در بدن و همچنین با توجه به اینکه امروزه از فناوری نانو و مخصوصاً نانوذرات آهن در مصارف روزانه استفاده می‌کنند، این مسئله ما را بر آن داشت تا به اجرای یک طرح تکمیلی به صورت دقیق‌تر نقش نانو ذرات مغناطیسی آهن را بر روی پروتئین p53 در مغز بیش از پیش مورد مطالعه و بررسی قرار دهیم. خاصیت مغناطیسی به مقدار بسیار زیادی به اندازه‌ی ذره وابسته است [۴].

هر ماده‌ی مغناطیسی در حالت توده، از حوزه‌های مغناطیسی تشکیل شده است. یکی از مهمترین ویژگی‌های نانو مواد این است که در صورت تغییر اندازه، تغییرات شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی واضحی را بوجود می‌آورند. بنابراین مواد با تغییر در اندازه از توده‌های نانومتری، تبدیل به مواد جدیدی با خواص جدید می‌شوند که بر سیستم‌های بیولوژیک بخصوص انسان تأثیر می‌گذارند که البته هنوز شناخته شده نیستند و مستلزم تحقیقات گسترده می‌باشند. برای کاهش سمیت، افزایش خواص زیست سازگاری و امکان کاربرد این نانوذرات در درمان هدف-گیری شده از پوشش‌های مناسب بر سطح آنها استفاده

می‌شود. جهت تامین بخشی از خواص فوق می‌توان از پلی‌اتیلن گلايکول، دکستران پلی وینیل الکل و اوره نام برد [۳، ۷].

نانوذرات آهن دارای خواص بیولوژیکی فعالی هستند و نسبت به نمک‌های آهن غیرآلی کمتر سمی هستند. نانوذرات اکسید آهن می‌توانند توسط فاگوسیتوز یا اندوسیتوز وارد سیستم رتیکیولوآندوتلیال شوند و همچنین می‌توانند توسط سلول‌های فاگوسیتیک مثل مونوسیت، ماکروفاژ و الیگودندروسیت گرفته شوند. نانوذرات می‌توانند توسط افزایش استرس اکسیداتیو به سلول آسیب برسانند. نانوذرات آهن در معده حل نمی‌شوند و وارد دئودنوم می‌شوند. نانوذرات در تولیدات طیور برای رفع کامپیلوباکترها و *اشرشیا کولی* استفاده می‌شوند [۱۲، ۱۳]. خورشیدی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ بر روی اثرات رفتاری نانوذرات اکسید آهن بر روی موش صحرائی، تخریب حافظه مطالعه کردند. میزان اثرات نانو ساختارها بر روی سلول‌ها به غلظت آنها، نوع سلول مورد هدف، شکل و اندازه‌ی نانو ساختارها بستگی دارد. همچنین پروتئین‌های اطراف نانومیله‌ها بدنال آگلو مریزاسیون، شرایط زیستی سلول‌ها را به مخاطره انداخته و باعث مرگ سلول‌ها می‌شود [۱]. متابولیسم آهن سبب تخریب سطح نانوذرات آهن پارامغناطیسی و به دنبال آن افزایش غلظت یون آهن و القاء استرس اکسیداتیو می‌شود.

هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثرات دوزهای ۱۰۰ و ۳۰۰ ppm نانوذرات اکسید آهن با تزریق درون صفاقی بر میزان بیان پروتئین p53 در بافت مغز موش بوده است.

#### مواد و روش کار

موش‌های سوری نژاد Balb/c از انیستیتو پاستور ایران تهیه گردید. موش‌ها حدود دو ماه سن و وزن تقریبی ۲۵ تا ۳۵ گرم بودند. موش‌ها در حیوانخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان و در شرایط استاندارد، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته، دمای نسبی  $23 \pm 2$  درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ تا ۴۰ نگهداری شدند.



دمای ۴ درجه یخچال در ظرف دربدار مربوط به منظور جلوگیری از خشک شدن، آنتی بادی، نمونه‌ها با یک قطعه پارافیلیم پوشیده شد. شستشو با PBS، محلول تازه H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> به مدت ۳۰ دقیقه، شستشو با PBS، استفاده از محلول بیوتین به مدت ۳۰ دقیقه، استفاده از محلول Avedin به مدت ۳۰ دقیقه، شستشو با PBS، استفاده از DAB رقیق شده به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و در نهایت نمونه مشاهده می‌شود. جهت تعیین میزان بیان پروتئین P53 در بافت مغز از رنگ آمیزی اختصاصی ایمنوهیستوشیمی استفاده گردید و نتایج توسط نرم افزار SPSS و آزمون توکی و دانکن بدست آمد.

### نتایج

در بررسی بافت‌شناسی برای تعیین آسیب بافتی و بیان پروتئین p53 در بافت مغز از رنگ‌آمیزی اختصاصی ایمنوهیستوشیمی استفاده شد. نتایج آماری در نمودار ۱ مشاهده می‌شوند. مقاطع بافتی توسط میکروسکوپ نوری عکسبرداری شده و در شکل ۱ ارائه شده‌اند. بر اساس نتایج بدست آمده و میزان بیان پروتئین p53 در مغز موش سوری نژاد Balb/c که به مدت ۸ روز به صورت تزریق درون صفاقی در معرض نانو ذرات اکسید آهن قرار گرفته بودند مشخص شد که در هر دو گروه تیمار اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود. نتایج نمودار ۱ نشان می‌دهد که افزایش معنی‌داری در سطح  $p < 0/05$  در گروه تیمار ۱۰۰ ppm نسبت به گروه کنترل و همچنین در گروه تیمار ۳۰۰ ppm در سطح  $p < 0/01$  نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود.

روزانه غذا و شیشه‌های آب آنها کنترل گردید. در این تحقیق از پودر نانوذرات مغناطیسی آهن با اندازه ۲۰ نانومتر که از شرکت پیشگامان نانو (مشهد-ایران) خریداری شد، استفاده گردید. موش‌های انتخاب شده همگی از جنس نر بودند و از هر موش فقط یک بار استفاده شده است. جهت انجام کار، ابتدا موش‌ها وزن شده و به طور تصادفی تقسیم شدند و برای هر گروه ۵ عدد موش تعریف شد. سپس در مرحله‌ی بعدی حیوانات به گروه‌های زیر تقسیم شده و به مدت ۸ روز به صورت تزریق درون صفاقی نانوذرات را دریافت نمودند:

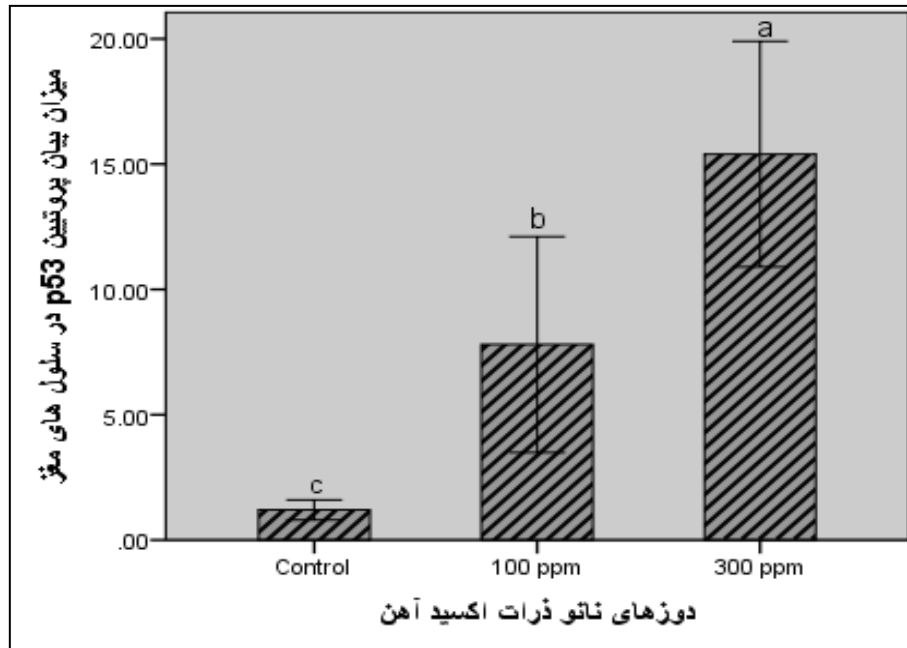
۱- گروه کنترل: موش‌های دریافت کننده آب معمولی (آب مقطر).

۲- گروه تجربی I: موش‌های دریافت کننده نانوذرات اکسید آهن به میزان ۱۰۰ ppm.

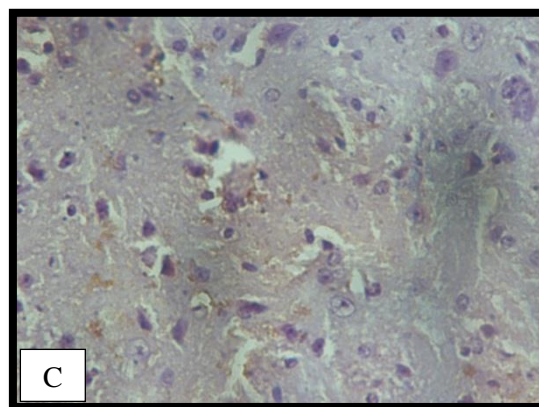
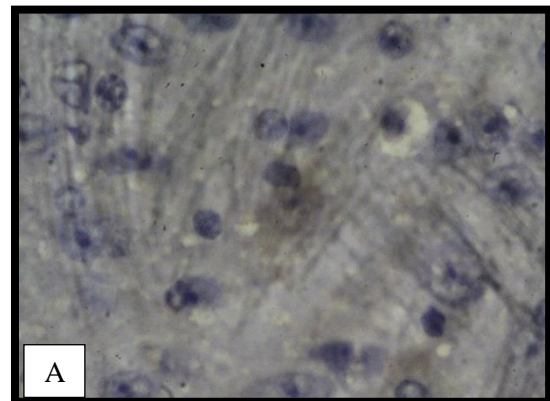
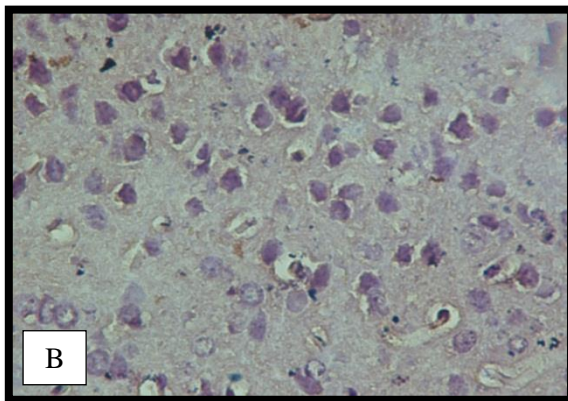
۳- گروه تجربی II: موش‌های دریافت کننده نانوذرات اکسید آهن به میزان ۳۰۰ ppm.

در روز هشتم موش‌ها توسط کلروفرم بیهوش و پس از آن در سینی تشریح حاوی پارافین ثابت گردیدند. مغز موش‌ها طوری که آسیب نبینند از درون جمجمه خارج کرده و داخل فرمالین گذاشته شدند. نمونه‌ها پس از گذراندن دوره ۴۸ ساعته درون فرمالین، جهت رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی آماده گردیدند. این رنگ‌آمیزی به ترتیب شامل مراحل زیر می‌باشد:

پارافین‌زدایی لام‌ها و آبدهی با درجات نزولی الکل، سه مرحله پنج دقیقه‌ای شست و شوی لام‌ها با محلول PBS، محلول بلاک کننده به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه در ظرف مرطوب، آنتی‌بادی اولیه یک شب در



نمودار ۱- میانگین  $\pm$  انحراف معیار تاثیر نانوذرات مغناطیسی آهن بر بیان پروتئین p53 در بافت مغز. افزایش معنی دار ( $p < 0/05$ ) در تیمار ۱۰۰ و تیمار ۳۰۰ ( $p < 0/01$ ) نسبت به گروه کنترل نشان داده شد. نمودار عمودی بر اساس شمارش سلولهای رنگ آمیزی شده در هر مقطع بوده است.



شکل ۱- نمای میکروسکوپی از برش مغز در گروه‌های تحت آزمایش به روش رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی. تصویر A: گروه کنترل، تصویر B: دریافت کننده دوز ۱۰۰ ppm با بزرگنمایی  $\times 400$  و تصویر C: دریافت کننده دوز ۳۰۰ ppm با بزرگنمایی  $\times 400$ . همان گونه که مشاهده می‌شود مقدار پروتئین p53 در این بافت افزایش پیدا کرده است.

## بحث

و تجزیه نوروترانسمیترها به دیگر پروتئین‌های حاوی آهن، که ممکن است مستقیم یا غیر مستقیم عملکرد مغز را تغییر دهند، شرکت می‌کند مغز به چند دلیل به آهن نیاز دارد از جمله: آهن در فنیل‌آلانین، هیدروکسیلاز، تیروزین هیدروکسیلاز و همچنین در مسیر نوروترانسمیترهای دوپامینرژیک، میلین‌سازی، در میتوکندری‌ها برای افزایش سطح تولید انرژی و برای همانندسازی DNA چرخه سلولی مشارکت دارد [۱۰].

هومئوستاز آهن مغز برای عملکرد طبیعی آن ضروری است. علیرغم اهمیت آن برای عملکرد طبیعی هومئوستاز آهن در دستگاه عصبی مرکزی به خوبی شناخته نشده است. در مطالعه‌ای که توسط دی لیما و همکارانش در سال ۲۰۰۵ صورت گرفت، بیان کردند که تیمار با آهن در دوره نوزادی حافظه شناختی بلند مدت را در موش صحرائی بالغ تخریب می‌کند و در نواحی خاصی از مغز در شکل‌گیری حافظه نقش دارد، آسیب‌های اکسیداتیو ایجاد می‌کند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر نشان دادند که تیمار با آهن در دوره نوزادی منجر به پراکسیداسیون لیپیدها و کربونیل‌اسیون پروتئین‌ها در هیپوکامپ، قشر مغز و جسم سیاه می‌شود که نهایتاً منجر به ضعف شناختی می‌گردد. همچنین مشاهدات بافت‌شناسی حاصل از تجویز درون بینی نانوآکسید آهن به صورت مزمن نشان داد که میلین نوروها در ناحیه هیپوکامپ دچار تخریب شده است. نتایج به دست آمده از مطالعه آنها نشان‌دهنده‌ی اثر مضر استشمام نانوذرات در مغز می‌باشد. مغز انسان حساس‌ترین و پیچیده‌ترین عضو در بدن است که توسط سد بسیار کارآمد به نام سد خونی-مغزی محافظت می‌شود. این سد به خوبی قابلیت دفاع از سلول‌های مغزی را در برابر محتویات خون و ترکیبات سمی موجود در آن دارد. اما همین سد ورود داروها به مغز را نیز محدود می‌نماید. برای دسترسی داروها به بافت مغز می‌توان از تزریقات داخل نخاعی استفاده کرد که البته محدود به نواحی خاصی از مغز است و روشی تهاجمی محسوب

فقدان ژن‌های مهار کننده توموری باعث تقسیم غیرقابل کنترل سلول‌های سرطانی می‌شود. ژن مهارکننده P53 روی کروموزوم 17p13-1 قرار دارد. طول این ژن pbs ۲۰۰۰ است که پروتئین به طول ۳۹۳ اسید آمینه می‌سازد [۶]. ژن P53 که در سال ۱۹۹۳ به نام مولکول سال و ژن نگهبان شناخته شد بطور طبیعی تقسیم و رشد سلول را تحت نظر کامل دارد. هنگامی که این ژن موتاسیون پیدا می‌کند باعث تولید یک پروتئین غیر معمولی می‌شود که نه فقط به اعمال طبیعی خود جامه عمل نمی‌پوشاند بلکه همه ژن‌هایی که تحت فرمانده این پروتئین انجام وظیفه می‌کردند طغیان خواهند کرد و یک سری از روابط مولکولی و بیولوژیکی تقسیم سلولی از مسیر طبیعی خود خارج می‌شود و سلول به سوی سرطانی شدن پیشروی می‌کند. روی این اصل موتاسیون ژن P53 در بیش از ۳۵ نوع ژن-های مهار کننده تا به حال شناسایی و گزارش شده‌اند [۹]. وظایف پروتئین P53 در حال طبیعی تنظیم تقسیم سلول-ها، مسن شدن سلول‌ها، عروق‌سازی، تمایز یافتن سلول-ها، و متابولیسم DNA است. بیش از ۲۶۰۰۰ موتاسیون ژنتیکی در ژن P53 گزارش شده است. بیشتر این موتاسیون‌ها در ناحیه‌ی DNA-binding اتفاق می‌افتد که باعث می‌شود ژن‌های تحت کنترل P53 نتوانند نسخه برداری نمایند. هرچه ذره کوچکتر می‌شود نسبت سطح به حجم آن بیشتر می‌شود و واکنش شیمیایی و بیولوژیکی آن افزایش می‌یابد. واکنش شیمیایی بیشتر نانو مواد منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد از جمله رادیکال‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) می‌شود. استفاده از یک غلظت رو به بالا و افزایشی از نانو ذرات اکسید آهن، منجر به افزایش ROS شد که در ادامه آسیب و مرگ سلولی را سبب گردید [۲].

بیشتر موجودات زنده برای بقاء خود به آهن نیاز دارند، آهن برای تکامل دستگاه عصبی مرکزی حیاتی است و در چندین فرایند متابولیک مغزی شرکت می‌کند، مطالعات اخیر گزارش کرده اند که آهن در سنتز بسته‌بندی، جذب



در سلول افزایش می‌یابد از آنجایی که میزان این پروتئین در بافت‌های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است می‌توان احتمال داد که این نانوذرات توانسته‌اند از موانع موجود عبور کرده و وارد سلول شده باشند و باعث آسیب به DNA شوند که در این صورت مقدار این پروتئین در سلول افزایش یافته و سلول در جهتی پیش می‌رود که آسیب وارده به DNA را ترمیم کند یا در جهت مرگ برنامه‌ریزی شده پیش رود.

### منابع

1. سهرابی، د. غلامی، م. ۱۳۸۸. بررسی اثرات مزمن فلز روی (کلرید روی) بر بافت‌های کبد، کلیه، طحال، در موش صحرایی نر. فصلنامه زیست‌شناسی تکوینی، سال اول، شماره دوم، صفحات ۱۴-۹.
2. رضانی، ز. ۱۳۹۲. بررسی میزان رسوب نانوذرات نقره و نیترات نقره در بافت‌های مختلف کبد، کلیه، بیضه، طحال، و بررسی هیستوپاتولوژی بافت‌های کبد، کلیه و بیضه. پایان نامه کارشناسی ارشد تکوینی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان.
3. محمدزاده پ.، سهرابی حقدوست ا.، مرتضوی پ. ۱۳۹۳. تغییرات ژن P53 در آدنوماتوز ریوی گوسفند به روش ایمونوهیستوشیمی. مجله پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، سال یازدهم، شماره اول، صفحات ۱۱۸۲-۱۱۷۳.

4. De Jong W.H., Roszek B., Geertsma R.E. (2005), Nanotechnology in medical applications: possible risks for human health. RIVM report 265001002/2005.

5. Franks A. (1987), Nanotechnology. *Journal of Physics E: Scientific Instruments*, 20(12): 1442

6. Fesik S.W., Shi Y. (2001), Controlling the caspases. *Science*, 294(5546): 1477-1478.

7. Mahmoudi M., Simchi A., Imani M., Shokrgozar M.A., Milani A.S., Hafeli U.O., Stroeve P. (2010), A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of

می‌شود. روش‌های غیرتهاجمی دسترسی به مغز بهترین راه دارو رسانی به آن هستند. با توجه به سطح تماس زیاد خون با مغز (حدود ۲۰ متر مربع) انتظار می‌رود داروها از این راه قابلیت جذب داشته باشند.

با توجه به بیان پروتئین p53 در مغز برآورد می‌شود که این ذرات در دوزهای بالاتر توانسته‌اند از سد خونی-مغزی عبور کنند و باعث تغییر بر روی سلول‌های مغزی گردند. نانوذرات وقتی وارد خون می‌شوند قدرت یونی بالا و هتروژنیستی محلول موجب تجمع نانوذرات در خون می‌شود که در نهایت موجب تغییر خواص مغناطیسی و توقف آنها می‌شود. برخی مطالعات نشان داده است که نانوذرات می‌توانند از طریق تزریق درون بینی به مغز برسند که مانع از تأثیر حفاظتی سد خونی-مغزی می‌شود. از طریق این روش ذرات یا یون‌های فلزی کوچک به طور مستقیم از طریق موکوس بینی وارد چرخه خون شده و از طریق انتقال آکسونی بین نورون وارد پیاز بویائی و به دنبال آن به طور مستقیم از طریق اپی تلیوم پیاز بویائی وارد مغز می‌شود [۸]. نانوذرات به علت ویژگی‌هایی از قبیل قابلیت عبور از رگ‌ها (قطر ذرات در حد نانومتر) عمر طولانی در خون و عدم اثر ماکروفاژها بر آنها، غیر تهاجمی بودن برای مغز و قابلیت انتقال دارو به داخل سلول گزینه مناسبی برای انتقال می‌باشند. بنابراین نانوداروها برای انتقال داروهایی که نفوذ کمی به سلول مغزی دارند استفاده می‌شوند و با توجه به اندازه کوچک این ذرات، آنها آزادانه در عروق خونی حرکت می‌کنند و به بافت مغزی وارد می‌شوند. در نتیجه دارورسانی به مغز از راه نانو ذرات می‌تواند یکی از شاخه‌های قابل پیشرفت برای درمان بیماری‌ها با کمک فناوری نانو باشد.

### نتیجه‌گیری

میزان پروتئین P53 در بافت مغز پس از مصرف نانوذرات مغناطیسی آهن افزایش پیدا کرده است، شد میزان پروتئین P53 در حالت طبیعی در سلول بسیار کم است و در صورتی که آسیبی به DNA وارد گردد سطح این پروتئین



11. Nikonov I.N., Folmanis Y.G., Folmanis G.E., Kovalenko L.V., Laptev G.Y., Egorov I.A., Fisinin V.I., Tananaev I.G. (2011), Iron nanoparticles as a food additive for poultry. *Doklady Biological Sciences*, 440: 328-331.
12. WU X., Tan Y., Mao H., Zhang M. (2010), Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells. *International Journal of Nanomedicine*, 5: 385-399.
13. Zimmermann M.B., Hilty F.M. (2011), Nanocompounds of iron and zinc: their potential in nutrition. *Nanoscale*, 3(6): 2390-2398.
8. Massia S.P., Stark J., Letbetter D.S. (2000), Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. *Biomaterials*, 21(22): 2253-2261.
9. Manuja A., Kumar B., Sing R.K. (2012), Nanotechnology developments: opportunities for animal health and production. *Nanotechnology Development*, 2(1): 17-24.
10. Naqvi S., Samim M., Abdin M.Z., Ahmed F.J., Maitra A.N., Prashant C.K., Dind A. (2010), Concentration dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International Journal of Nanomedicine*, 16(5): 983-989.

