



## The acute toxicity of urea coated ferrous oxide nanoparticles on L929 cell line, evaluation of biochemical and pathological parameters in rat kidney and liver

Sarieh Ghasempour<sup>1</sup>, Mohammad Ali Shokrgozar<sup>2</sup>, Roghayeh Ghasempour<sup>3</sup>, Mohsen Alipour<sup>1\*</sup>

1. Dept. of Physiology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

2. Pasteur Institute of Iran, National Cell Bank, Tehran, Iran

3. Renewable Energy of Environment Engineering Department, Faculty of New Science of Technology, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 25 Jul 2013

Accepted: 21 Nov 2013

### Abstract

**Introduction:** Iron plays an important role in physiological processes as a trace element. Today, iron oxide nanoparticles have attracted extensive attention due to their super paramagnetic properties and a variety of potential applications in many fields. The main objective of this study was to evaluate in vitro and in vivo toxic effects of the iron oxide nanoparticles on L929 cell line, kidney and liver function, in order to achieve a safe application of the mentioned nanoparticles.

**Methods:** The toxicity effects of 200 and 800 µg/ml iron oxide nanorods on L929 were determined using (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test. One and 24 h after the injection of iron oxide via tail vein, serum iron, blood urea nitrogen (BUN) and liver enzymes (ALT, AST, and ALP) were measured as indicators of the kidney and liver function, respectively. Histopathological studies on liver and kidney was carried out using light microscopy following tissue processing steps and standard H&E staining.

**Results:** The viability of the cells exposed to iron oxide nanorods, was decreased with increasing dose. No significant differences were observed between biochemical factors, 1 and 24 h after the injection of nanoparticles. Serum iron level showed no difference with control 1 h after the injection. However, it exhibited a significant increase 24 h after the injection as compared to the control. Meanwhile, pathological studies did not show any acute toxic damage.

**Conclusion:** Use of the iron oxide in short-time and in doses less than 800µg/ml may be safe. More studies are needed for accurate assessment of the toxicity of these particles in terms of dose, time and the type of covering.

**Key words:** nanorods ironoxide, viability, MTT, liver, kidney

\* Corresponding author e-mail: alipourmohsen@yahoo.com  
Available online at: www.phypha.ir/ppj

## مطالعه‌ی اثرات سمی حاد نانو ذرات اکسید آهن با پوشش اوره بر رده‌ی سلولی L929، پارامترهای بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیک کلیه و کبد در موش صحرایی

سریه قاسم پور<sup>۱</sup>، محمدعلی شکرگزار<sup>۲</sup>، رقیه قاسم پور<sup>۳</sup>، محسن علیپور<sup>۱\*</sup>  
۱. گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان  
۲. انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی ایران، تهران  
۳. گروه انرژی‌های نو و محیط زیست دانشگاه تهران، تهران

پذیرش: ۳۰ آبان ۹۲

دریافت: ۳ مرداد ۹۲

### چکیده

**مقدمه:** آهن به عنوان یک ریز مغذی نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیک ایفا می‌کند. امروزه نانو ذرات اکسید آهن به دلیل خواص سوپر مگنتیک و کاربردهای بالقوه‌ی فراوان در بسیاری از زمینه‌ها، توجه زیادی را به سوی خود جلب کرده است.  
**روش‌ها:** سمیت نانومیله‌های آهن با دوزهای ۲۰۰ و ۸۰۰  $\mu\text{g/ml}$  بر روی رده‌ی سلولی L929 توسط تست 5-(2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-imidazolium bromide (MTT) در ۲۴ ساعت بررسی گردید. یک و ۲۴ ساعت پس از تزریق نانومیله‌ها به ورید دم موش صحرایی، آهن سرم و همچنین نیتروژن اوره‌ی خون و آنزیمهای کبدی شامل آلانین آمینو ترانسفراز، اسپاراتات آمینو ترانسفراز و آلکالین فسفاتاز، به ترتیب به عنوان شاخصهای عملکرد کلیه و کبد اندازه‌گیری شدند. مطالعات هیستوپاتولوژیک توسط رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین و میکروسکوپ نوری انجام شد.  
**یافته‌ها:** میزان زیست پذیری سلولها با افزایش دوز کاهش یافت. فاکتورهای بیوشیمیایی خون یک و ۲۴ ساعت پس از تزریق نانو ذرات افزایش معنی‌داری نداشتند. سطح آهن سرم ۱ ساعت بعد از تزریق تغییری نشان نداد. اما پس از ۲۴ ساعت افزایش معنی‌دار نشان داد. در لامهای تهیه شده از ارگانها نیز آثار سمیت حاد دیده نشد.  
**نتیجه گیری:** استفاده از نانومیله‌های اکسید آهن در دوز مصرفی آن در تصویر برداری، ایمن تلقی می‌شود. ارزیابی دقیق در خصوص سمیت این ذرات بر حسب دوز، نوع پوشش و زمان استفاده، مستلزم مطالعات بیشتر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: نانومیله‌های اکسید آهن، زیست پذیری، MTT، کبد، کلیه

### مقدمه

صنعت توجه و علاقه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است. نانو ماده‌ها موادی هستند که در یک، دو و یا سه بعد در اندازه‌ی ۱۰۰-۱ nm می‌باشند. در حالیکه نانوذرات موادی کروی هستند که در هر سه بعد در اندازه‌ی نانومتری هستند. مشتقات نانو ذرات سوپر پارا مغناطیسی اکسید آهن با پوششهای مختلف در سیستم دارورسانی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۸، ۲۷]. بسیاری از محققین اخیراً درصدد دستیابی به

استفاده و کاربرد نانو فناوری در شاخه‌های مختلف علوم از جمله پزشکی، داروسازی، تصویربرداری، محیط زیست و

alipourmohsen@yahoo.com  
www.phypha.ir/ppj

\* نویسنده مسئول مکاتبات:  
وبگاه مجله:

[۲۲]. بنابراین 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 تأمین بخشی از خواص فوق می‌توان از پلی اتیلن گلیکول<sup>۱</sup> (PEG) [۱۲]، دکستران [۲۵]، کیتوسان [۱۳]، پلی‌وینیل‌الکل [۱]، طلا [۱۵] و اوره نام برد. مواد ذکر شده بعنوان پوشش‌های آلی و غیر آلی معیابی نیز دارند که می‌توان از آن به بروز سمیت، آگلومریزاسیون، انحلال پذیری در غشاء سلول و ایجاد سمیت بیشتر اشاره کرد [۲۵].

کبد و کلیه از ارگانهای داخلی بدن هستند که در تصفیه و دفع مواد زائد بدن نقش اساسی دارند. نانوساختارها پس از ورود به بدن به ارگانهای زیادی مانند کبد، طحال، کلیه، مغز ریه و سیستم گوارشی وارد می‌شوند. اخیراً گزارش شده است که نانوذرات  $Fe_2O_3$  با اثر بر روی کبد و کلیه باعث افزایش فعالیت آنزیمهای کبدی و کاهش عملکرد کلیوی می‌شوند [۱۴]. این ذرات بر اساس خواص شیمیایی و فیزیکی مانند جنس، اندازه، شکل و غلظت در ارگانهای مختلف بدن رسوب می‌کنند. تا جایی که بررسی‌های ما نشان می‌دهد، در مورد اکسید آهن با پوشش اوره و اثرات آن به صورت *In vivo* و *In vitro* مطالعاتی انجام نشده است. لذا مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار اثرات سمی نانوذرات اکسید آهن بر زیست پذیری سلولهای L929 به صورت *In vitro* و نیز تأثیر ذرات مذکور بر تغییرات بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیک کلیه و کبد در موش صحرایی را به عنوان اهداف این مطالعه مورد بررسی قرار داده است. در این تحقیق از دوز تأیید شده<sup>۲</sup> (FDA) الگوبرداری شد. مقدار این دوز تأیید شده،  $560 \mu\text{g}/\text{kg}$  از نانوذرات آهن با پوشش دکستران می‌باشد [۲۸]. این دوز میزانی است که در تصویربرداری تأیید شده و به صورت داخل وریدی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی در بخش *In vitro*، به تأثیر

موارد استفاده دارویی [۱۱] بخصوص دارورسانی هدفمند نانوساختارها، تصویربرداری پزشکی با کمک نانوساختارها [۹] و وسایل پزشکی در مقیاس نانومتری هستند [۲۳]. 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 توده‌ای به 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. استفاده از نانو مواد در سیستم‌های بیولوژیک مستلزم دانستن چگونگی تعاملات بین نانوساختارها با پروتئین‌ها، سلولها، هورمونها و فاکتورهای ایمنی در این سیستم‌ها می‌باشد [۱۸]. مطالعات زیادی در فازهای *In vitro* و *In vivo* بر روی این نانوساختارها انجام شده است و نتایج متفاوتی نیز گزارش شده است [۲]. بنابراین هر نوع نانوساختاری که ساخته می‌شود مستلزم انجام آزمایشات دقیق و کامل است تا بتوان از آن در موارد انسانی و یا در صنایع و محیط‌هایی که انسان با آنها در ارتباط است، استفاده کرد. برخی از این نانوساختارها از عرض غشاء سلولی عبور کرده و به میتوکندری می‌رسند و آثار خود را اعمال می‌کنند [۶].

مواد سمی می‌توانند منجر به پاسخهای گوناگونی در سلولها شوند [۲۹]. دانشمندان بطور عمده بر روی مکانیسمهایی که باعث مرگ سلولی می‌شوند، متمرکز شده‌اند. بنابراین فاکتورهایی که در آپوپتوز و یا نکروز سلولی دخیل هستند مورد مطالعه قرار می‌گیرند [۱۷]. یکی از راه‌های سنجش سمیت نانوساختارها، تست MTT می‌باشد. MTT روشی است که از آن برای تشخیص توکسیسیتی یا سمیت استفاده می‌شود. محلول MTT ماده‌ای است که حاوی ماده‌ی رادیواکتیو نیست. میتوکندری در سلول سالم، MTT محلول در آب را به ترکیب غیر محلول در آب به رنگ ارغوانی، بنام فرمازان تبدیل می‌کند. نسبت درصد میزان فرمازان در سلولهای گروه آزمایش به سلولهای گروه کنترل نشانگر زیست پذیری آنهاست. بنابراین MTT میزان فعالیت متابولیکی سلولها را می‌سنجد.

با توجه به مطالعات انجام شده روی نانوذرات اکسید آهن بدون پوشش، مشخص شده است که بسیاری از این نانو ذرات اثرات سمی زیادی در سیستم‌های بیولوژیک اعمال می‌کنند

1. Polyethylene glycol  
2. Food and Drug Administration

آن محیط کشت (DMEM، ۱۰٪ FBS) افزوده شد. تهیه نانومیله‌های دارای پلی اتیلن گلیکول مطابق با روش ساخت نانومیله‌های بدون پوشش می‌باشد. با این تفاوت که پلی اتیلن گلیکول به محلول اولیه اضافه می‌شود.

جهت مواجهه‌ی نانو میله‌ها با سلولها، سلولها در چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شده و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت (DMEM، ۱۰٪ FBS) به روی آنها اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا سلولها به کف پلیت بچسبند. پس از طی این زمان، ۴۰ میکرولیتر از نانومیله‌ها روی سلولها ریخته شد سپس تا پایان ساعت مورد مطالعه (۲۴ ساعت) در انکوباتور قرار داده شدند. هر دوز از نانومیله‌ها در ۶ چاهک ریخته شد. این مراحل جهت تست MTT برای سه با چاهک تکرار گردید. پس از سپری شدن ۲۴ ساعت مواجهه نانومیله با سلول، پلیت از انکوباتور خارج شده و در زیر هود ابتدا محیط رویی سلولها خارج گردید و پس از آن به روی سلولها، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر حل شده در 0.15M (PBS) اضافه شد. پلیت در برابر نور بوسیله‌ی کاغذ آلومینیومی محافظت شد و در انکوباتور به مدت ۴ ساعت قرار گرفت. پس از سپری شدن ۴ ساعت، پلیت از انکوباتور خارج گردید. محلول MTT از روی سلولها برداشته شده و ۱۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول به هر چاهک اضافه گردید مجدداً به مدت زمان ۲۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت تا بلورهای تشکیل شده در الکل حل گردد. پس از آن به منظور بدست آمدن محلول یکنواخت، پلیت به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. مقدار غلظت ماده حل شده در ایزوپروپانول با دستگاه الیزاریدر (STAT FAX 2100 USA)، در طول موج ۵۴۵ نانومتر محاسبه شد.

چاهک‌هایی که دارای سلول‌های بیشتری باشند، چگالی نوری<sup>۴</sup> (OD) بالاتری نسبت به چاهک‌های دارای سلول کمتر نشان می‌دهند. بنابراین می‌توان از رابطه زیر زیست پذیری (viability) سلول‌ها را مشخص کرد و با نمونه کنترل مقایسه نمود.

نانومیله‌های اکسید آهن در دوزهای پایین (۲۰۰ μg/ml) و بالا (۸۰۰ μg/ml) و با دو نوع پوشش اوره و پلی اتیلن گلیکول به مدت ۲۴ ساعت، بر روی سلولهای رده‌ی L929 پرداخته شده است. تعیین سمیت یا سلامت نانومیله‌های ذکر شده با استفاده از 2-(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test انجام گردید. در آزمایشات انجام شده، هر کدام از دوزها علاوه بر کنترل با یکدیگر نیز مورد مقایسه قرار گرفتند. سلولهای L929 در محیط کشت<sup>۱</sup> DMEM که حاوی<sup>۲</sup> FBS ۱۰٪ می‌باشد، نگهداری می‌شدند. سلولها به تعداد ۱۰۰۰۰ در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰٪ و غلظت اکسیژن ۵٪ قرار داده شدند.

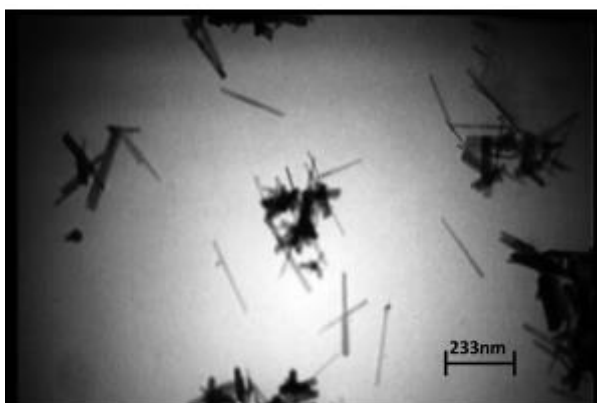
به منظور ساخت نانو میله‌های داری پوشش اوره، ابتدا اوره و آب دیونیزه در حضور گاز آرگن و با استیرر همزده شد. در حضور گاز آرگن نمک کلرید آهن (II) و نمک کلرید آهن (III) در محلول اسیدکلریدریک ۱ مولار حل شده، سپس به محلول اوره اضافه شده و مجدداً با استیرر همزده شدند. گاز آرگن باعث ایجاد محیطی عاری از اکسیژن می‌شود. پس از ۸ ساعت به محلول فوق اسید نیتریک ۰/۰۱ مولار اضافه گردیده و به مدت یک روز روی مگنت قرار داده شد. محلول رویی را جدا نموده و سپس ۲ مرتبه رسوب شستشو داده شد. در هر بار با ۵۰ میلی لیتر اسید نیتریک ۰/۰۱ مولار، شستشو انجام گردید. محلول نهایی در یخچال، در دمای ۶ درجه جهت کارهای بعدی نگهداری شد.

نانومیله‌ها پس از خارج شدن از یخچال و اطمینان از یکنواخت شدن محلول توسط ورتکس (vortex)، به میزان مورد نیاز از محلول برداشته و در فالكون ریخته شد. جهت اصلاح آنها، به میزان ۹ برابر حجم نانومیله، محیط کشت (DMEM، ۱۰٪ FBS) با آن افزوده گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از طی این زمان، محلول دور ۱۳۰۰ و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی برداشته شده و به میزان حجم اولیه محلول، به

3. Phosphate Buffer Sodium  
4. Optical Density

1. Dulbecco's Modified Eagle Medium  
2. Fetal Bovine Serum

به ترتیب برابر طول ۱۵۰ و ۲۳ نانومتر می‌باشد.



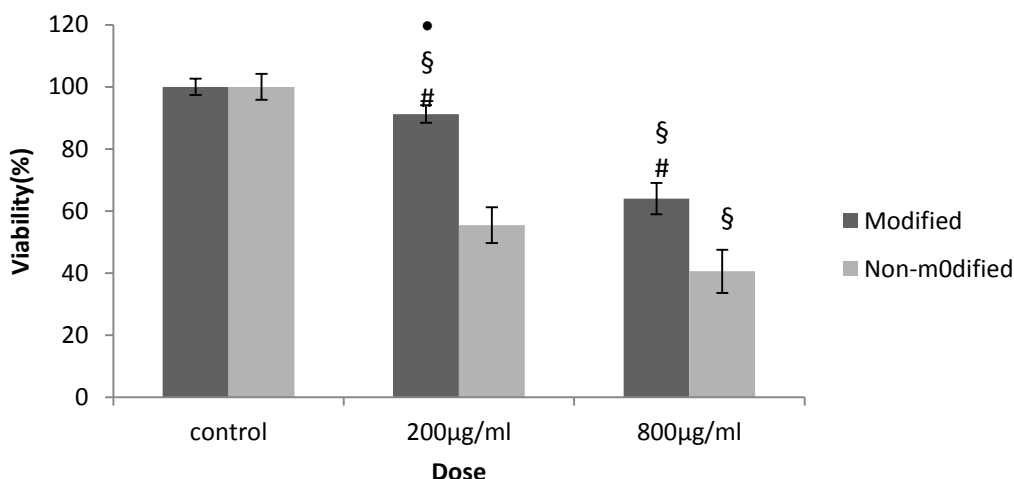
شکل ۱- نانومیله‌های اکسید آهن با پوشش اوره توسط میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمایی  $20 \times 10^3$

$$\text{Toxicity \%} = \left(1 - \frac{\text{mean OD of sample}}{\text{mean OD of control}}\right) \times 100$$

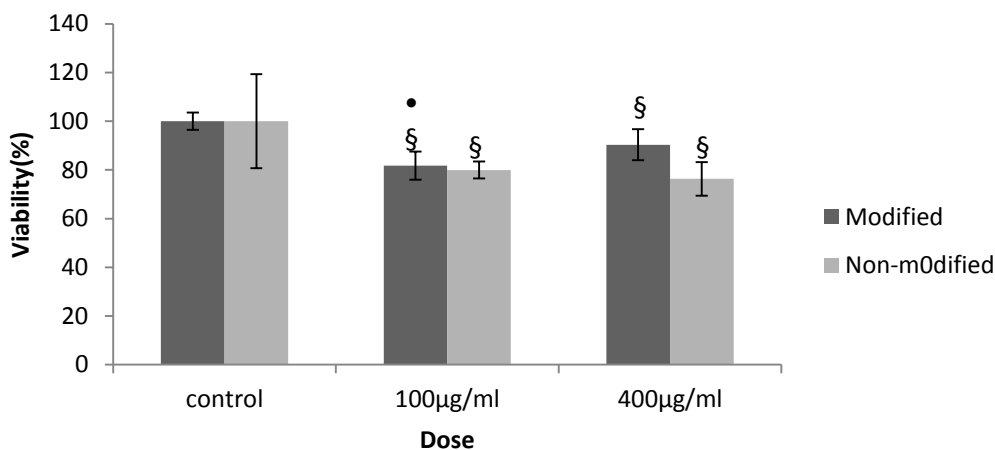
$$\text{Viability \%} = 100 - \text{Toxicity \%} \quad [7]$$

## یافته‌ها

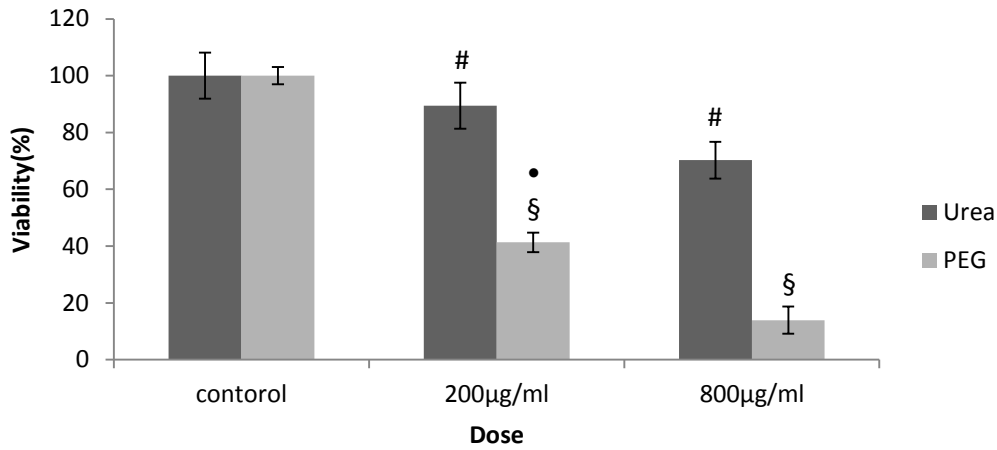
بطوری که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود، نانو میله‌های اکسید آهن به لحاظ مورفولوژی میله‌ای شکل هستند. بر اساس تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری، اندازه طولی و قطری نانومیله‌های دارای پوشش اوره به ترتیب برابر ۱۵۰ و ۲۳ نانومتر است. در مورد نانومیله‌هایی دارای پوشش پلی اتیلن گلیکول، اندازه‌ی طولی و قطری آنها



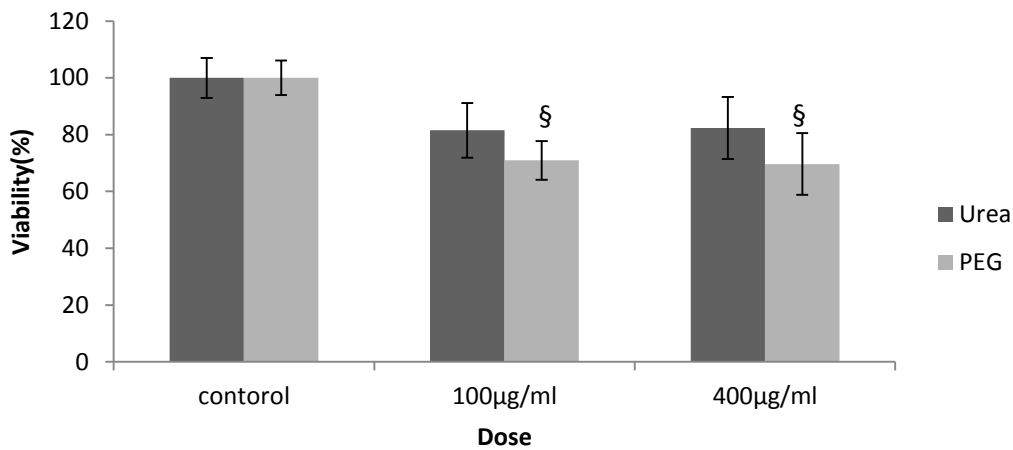
شکل ۲- مقایسه اثرات نانومیله‌های اکسید آهن اصلاح شده و نشده بر میزان زیست پذیری سلولی در ۲۴ ساعت. §:  $(p < 0.05)$  مقایسه هر دوز با کنترل، #  $(p < 0.05)$  مقایسه هر دوز با دوز مشابه خود، \*  $(p < 0.05)$  مقایسه‌ی دوز ۲۰۰ با  $800 \mu\text{g/ml}$  ستون‌ها نمایانگر میانگین  $\pm$  دامنه تغییرات می‌باشد.



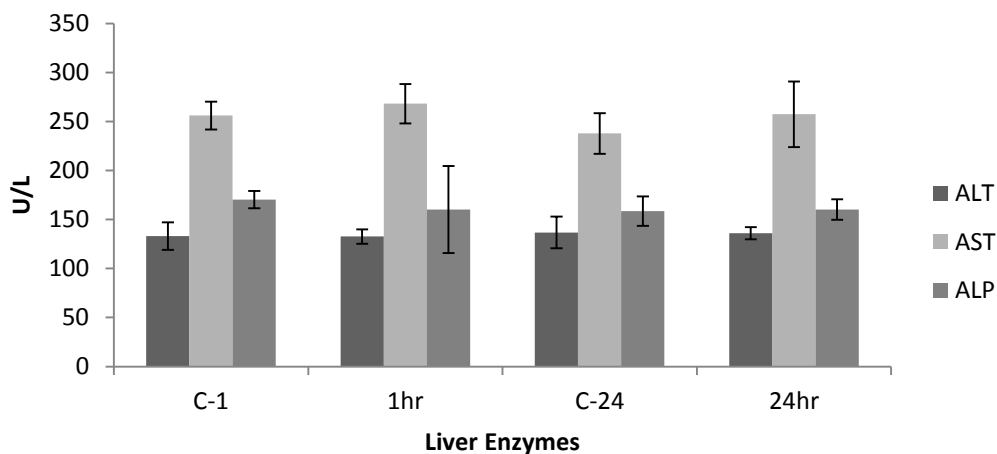
شکل ۳- مقایسه اثرات نانومیله‌های اکسید آهن اصلاح شده و نشده (بدون پوشش) بر میزان زیست پذیری سلولی در ۷۲ ساعت. §:  $(p < 0.05)$  مقایسه هر دوز با کنترل، #  $(p < 0.05)$  مقایسه هر دوز با دوز مشابه خود، \*  $(p < 0.05)$  مقایسه‌ی دوز ۱۰۰ با  $400 \mu\text{g/ml}$  ستون‌ها نمایانگر میانگین  $\pm$  دامنه تغییرات می‌باشد.



**شکل ۴-** مقایسه‌ی اثرات نانومیله‌های اکسید آهن با پوشش اوره و PEG بر میزان زیست پذیری سلولی با یکدیگر و کنترل در ۲۴ ساعت، §: ( $p < 0.05$ ) مقایسه هر دوز با کنترل، # ( $p < 0.05$ ) مقایسه هر دوز با دوز مشابه خود، •: ( $p < 0.05$ ) مقایسه‌ی دوز ۲۰۰ با ۸۰۰ µg/ml در PEG، ستون‌ها نمایانگر میانگین  $\pm$  دامنه تغییرات می‌باشد.

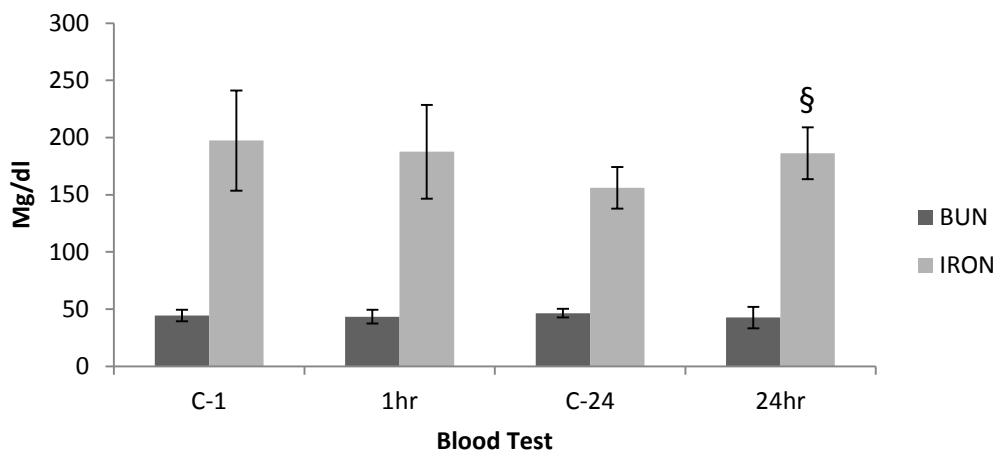


**شکل ۵-** مقایسه‌ی اثرات نانومیله‌های اکسید آهن با پوشش اوره و PEG بر میزان زیست پذیری سلولی با یکدیگر و کنترل در ۷۲ ساعت، §: ( $p < 0.05$ ) مقایسه‌ی هر دوز با کنترل، ستون‌ها نمایانگر میانگین  $\pm$  دامنه تغییرات می‌باشد.

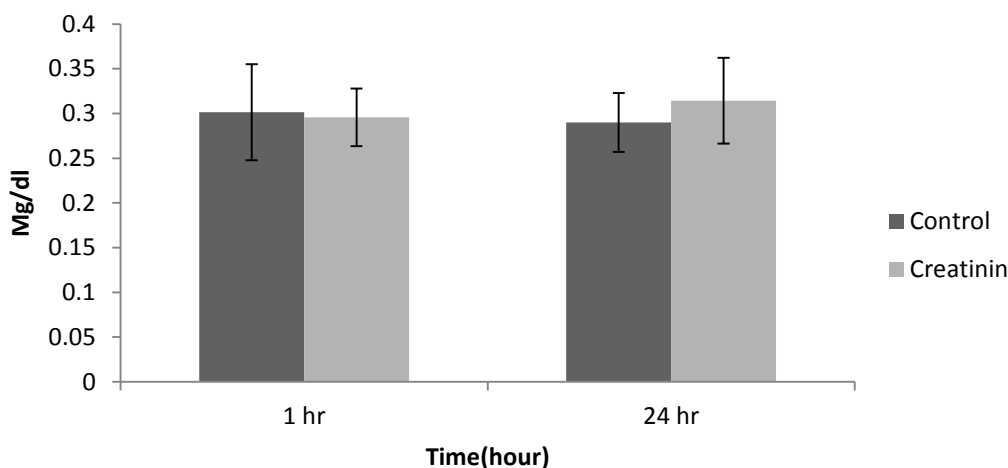


**شکل ۶-** مقایسه‌ی مقادیر آنزیم‌های کبدی ۱ و ۲۴ ساعت پس از تزریق نانو ذرات اکسید آهن به موش صحرایی. ستون‌ها نمایانگر میانگین  $\pm$  دامنه تغییرات می‌باشد. C-1: کنترل یک ساعت، C-24: کنترل ۲۴ ساعت.

ALT :Alanine Aminotransferase, AST :Aspartate Aminotransferase, ALP :Alkaline Phosphatase



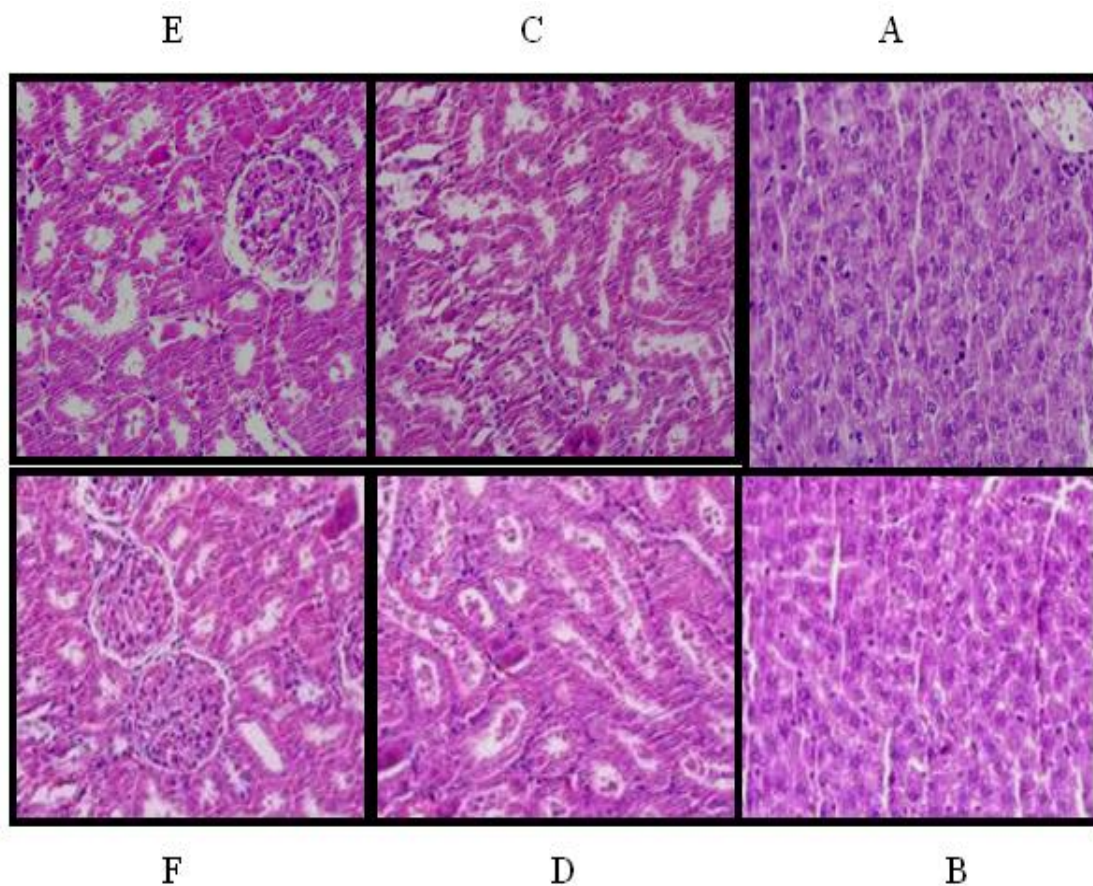
شکل ۷- مقایسه‌ی مقادیر نیتروژن اوره خون و آهن سرم ۱ و ۲۴ ساعت پس از تزریق نانو ذرات اکسید آهن به موش صحرایی. ستون‌ها نمایانگر میانگین  $\pm$  دامنه تغییرات می‌باشد. §:  $(p < 0.05)$  اختلاف معنی‌دار آهن با کنترل. Blood Urea Nitrogen: BUN



شکل ۸- مقایسه‌ی مقادیر کراتینین خون ۱ و ۲۴ ساعت پس از تزریق نانو ذرات اکسید آهن، ستون‌ها نمایانگر میانگین  $\pm$  دامنه تغییرات می‌باشد.

با توجه به شکل شماره ۲، دوزهای ۲۰۰ و ۸۰۰  $\mu\text{g/ml}$  نیز تست MTT شدند. طبق شکل مشاهده می‌شود که در ۷۲ ساعت نانومیله‌های اصلاح شده و نشده در دوزهای ثابت تفاوتی با یکدیگر در میزان سمیت ندارند. یکی از راههای ایمن‌تر کردن و هدفمند کردن دارورسانی استفاده از پوششهای متفاوت بر روی نانوساختارها می‌باشد. این پوششها اثرات متفاوتی را بر روی سلولها دارند لذا در این پژوهش نیز نتایج پوششهای اوره و پلی اتیلن گلیکول در شکل شماره ۴ نشان داده شده است. این دو نوع نانومیله پس از قرار گرفتن در محیط کشت حاوی FBS تعدیل (Modification) پیدا کردند و تست MTT بر روی آنها انجام شده و باهم مقایسه شدند. با توجه به شکل شماره ۴

با توجه به شکل شماره ۲، دوزهای ۲۰۰ و ۸۰۰  $\mu\text{g/ml}$  نانومیله‌های اصلاح شده و نشده نسبت به کنترل خود اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. در این نمودار پیداست که دوزها نیز نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند که این اختلاف با افزایش دوز در جهت کاهش میزان زیست‌پذیری سلولهای L929 می‌باشد. این نتیجه در مورد نانومیله‌های اصلاح نشده صادق نمی‌باشد. علاوه بر این، نکته قابل توجه این است که در دوزهای ثابت نانومیله‌های اصلاح نشده، میزان کمتری از زیست‌پذیری را نسبت به نانومیله‌های اصلاح شده نشان داده‌اند و این تفاوت در میزان زیست‌پذیری به لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد. برای نشان دادن میزان اهمیت زمان در این پژوهش، با توجه به شکل شماره ۳، دوزهای پایین‌تر شامل



شکل ۹- اثر نانو میله های اکسید آهن با دوز  $560 \mu\text{g/ml/kg}$  بر تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد (A) در مقایسه با کنترل (B)، توبول نفرون کلیوی (C) در مقایسه با کنترل (D) و گلوмерول (E) در مقایسه با کنترل (F).

عملکرد کلیوی، ۱ و ۲۴ ساعت پس از تزریق نانو میله‌ها تفاوتی با کنترل خود نشان ندادند (شکل‌های ۷ و ۸)، بطوری که در شکل شماره ۷ مشاهده می‌شود، سطح آهن سرم خون ۲۴ ساعت پس از تزریق نانو میله‌ها نسبت به کنترل خود افزایش معنی‌داری پیدا کرده است درحالی‌که این نتیجه در مورد ساعت اول پس از تزریق دیده نمی‌شود. همچنین در مطالعات میکروسکوپ نور، هیچگونه علائمی مبنی بر تغییر شکل، پارگی و چروکیدگی سلولهای کبدی و کلیوی، التهاب و یا هر نوع تغییر پاتولوژیک حاد دیگری مشاهده نشد.

## بحث

بر اساس نتایج این مطالعه در بخش *In vitro*، تمام نانومیله‌های اکسید آهن در تمام دوزها منجر به کاهش زیست پذیری سلولها شدند و با افزایش دوز، میزان زیست پذیری نیز کاهش بیشتری پیدا کرد و این مطلب نشاندهنده‌ی آسیب

مشاهده می‌شود که زیست پذیری سلولها در مواجهه با دوزهای مختلف نانومیله‌ها با پوشش اوره و PEG نسبت به کنترل خود اختلاف معنی‌دار دارند (به شکل شماره ۲ نیز توجه شود). همچنین شکل شماره ۴ اثرات سمی بیشتر و معنی‌دار نانو میله‌های دارای پوشش PEG با افزایش دوز را نشان می‌دهد. علاوه بر این در دوزهای ثابت نیز کاهش زیست پذیری سلولها بدنبال مواجهه با نانومیله‌های با پوشش PEG، تفاوت معنی‌داری را نسبت به پوشش اوره نشان داده‌اند. با توجه به شکل شماره ۵، نانومیله‌ها پوشش‌دار شده با PEG در دوزهای متفاوت در ۷۲ ساعت با کنترل خود تفاوت معنی‌دار دارند ولی با افزایش دوز اختلاف از بین می‌رود. در مطالعات حیوانی، دوز  $560 \mu\text{g/ml/kg}$  و کنترل مورد مطالعه قرار گرفته است. آنزیمهای کبدی شامل الاین آمینو ترانسفراز، اسپاراتات آمینو ترانسفراز و آلکالین فسفاتاز، ۱ و ۲۴ ساعت پس از تزریق نانو میله‌ها تفاوتی با کنترل خود نداشتند (شکل شماره ۶). مقادیر نیتروژن اوره خون و کراتینین نیز به عنوان شاخص‌های



پروتئین، با تعویض محیط کشت و افزودن محیطی تازه که حاوی پروتئین‌های جدید می‌باشد، دیگر در سطح نانومیلها فضایی برای اتصال پروتئین‌های جدید با نانومیلها وجود نخواهد داشت و لذا شرایط محیطی تغییری نکرده و از این رو محیط رشد سلولها، تغییراتی به نفع مرگ سلولی نخواهد داشت و رشد سلولها بهبود خواهد یافت [۱۹-۲۱]. بنابراین با این روش که همان اصلاح نانومیلها می‌باشد می‌توان بطور دقیقتری میزان مرگ سلولی بدنال اثرات مستقیم نانوذرات را بدست آورد. ضمن اینکه اصلاح کردن نانومیلها با پروتئین، راهی برای بالا بردن میزان ایمنی آنها می‌باشد. در راستای نتایج بدست آمده، در مطالعه‌ای که توسط محمودی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ انجام شده است، نانوذرات اکسید آهن کروی شکل بدون پوشش و پوشش داده شده با (PVA)، مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق هر دو نوع نانوذره (با و بدون پوشش) بصورت اصلاح شده و نشده، با تست MTT ارزیابی شده و میزان زیست پذیری سلولهای قرار گرفته در معرض نانوذرات اصلاح شده بیشتر از نوع اصلاح نشده‌ی آن گزارش شده است. علاوه بر این آثار سمی نانوذرات اکسید آهن در نوع بدون پوشش آن نیز گزارش شده است علت این آثار به دنبال صدماتی است که نانوذرات به DNA وارد کرده‌اند [۲۱]. نانوذرات اکسید آهن بر حسب دوز و زمان ممکن است اثرات مختلفی بر عملکرد ارگانهای بدن در شرایط *In vivo* و *In vitro* داشته باشند. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط خورشیدی و همکارانش در سال ۲۰۱۳، بر روی اثرات رفتاری نانوذرات اکسید آهن بر روی موش صحرایی انجام شده است، تخریب حافظه بدنال اثرات نانوذرات اکسید آهن مشاهده شده است [۲۴].

ما در این پروژه به منظور ارزیابی فاکتور زمان بر زیست پذیری سلولی، دوزهای ۱۰۰ و ۴۰۰  $\mu\text{g/ml}$  را در ۷۲ ساعت نیز مورد بررسی قرار دادیم. همانگونه که در شکل ۳ دیده می‌شود، دوزهای مشابه تفاوت معنی‌داری ندارند. بنظر می‌رسد که در زمانهای بالا مانند ۷۲ ساعت، اصلاح شدن نانومیلها محقق نمی‌شود و شرایط محیطی برای هر دو نوع نانومیلها یکسان می‌گردد. توجه به این نکته ضروری است که براساس اطلاعات شکل ۲، به نظر می‌رسد سلولها در ساعتهای اولیه مواجه با نانومیلها می‌میرند بنابراین در تستهای ۷۲ ساعت

رسان بودن بیشتر نانومیلها‌های اکسید آهن می‌باشد. همچنین زیست پذیری سلولها در مواجه با نانومیلها‌های دارای پوشش اوره بیشتر از نانومیلها‌های دارای پوشش پلی اتیلن گلیکول بود. مطالعات نشان داده است که یکی از مکانیزم‌هایی که نانو ذرات از طریق آن می‌توانند باعث آسیب و مرگ سلول و کاهش تعداد سلول‌های زنده شوند، آسیب مکانیکی است. یکی از بخشهای سلول که بیشتر مورد هدف نانو ذرات می‌باشد میتوکندریها هستند. هر چند نانو ذرات در مواجهه با سلولها رفتارهای متفاوتی را نشان می‌دهند، اما برخی از آنها بخصوص نانو ذرات میله‌ای شکل این توانایی را دارند که از غشاء سلولی عبور کرده و به اندامک‌های داخل سلولی و ترجیحاً میتوکندری‌ها بچسبند و عملکرد آنها را دچار اختلال نمایند [۴].

یکی دیگر از نتایج این مطالعه این است که میزان زیست پذیری سلولهایی که در معرض نانومیلها‌های اکسید آهن اصلاح شده قرار گرفته بودند در مقایسه به نانومیلها‌های اصلاح نشده، بیشتر بود. گزارشات موجود حاکی از آن است که نانو ذرات در مواجهه‌ی اولیه با سیستمهای بیولوژیک دچار تغییراتی می‌شوند که بطور ثانویه تغییراتی در محیط بیولوژیک را سبب می‌شوند که در نهایت به مرگ سلول منتهی می‌گردد. در این ارتباط یکی از شرایطی که بیشتر مورد بررسی قرار گرفته، تغییر اسیدیته‌ی سیستمهای بیولوژیک است که احتمالاً ناشی از تجمع پروتئین‌ها و تشکیل یک لایه پروتئینی به دور نانومیلها و اشباع سطح آنها از پروتئین است که تغییر pH محیط را بدنال خواهد داشت. سطح نانوذرات آهن دارای بار منفی است که منجر به جذب پروتئین‌های دارای بار مثبت می‌شود، بنابراین تغییر در میزان پروتئین‌های آزاد محیط بیولوژیکی منجر به تغییر در pH محیط می‌گردد، لذا روند مرگ سلولی را می‌توان به تغییر شرایط زیستی نامناسب سلول نسبت داد. البته در این میان نقش  $\text{Cl}^-$  در جذب شدن به نانوذرات و ایجاد تغییر در pH محیط، به طور واضحی در نانوذرات بدون پوشش نسبت به نانوذرات پوشش‌دار، ثابت شده است. نانوذرات بدون پوشش در تخریب اسیدهای آمینه و ویتامین‌های دارای HCl نیز نقش برجسته‌ای دارند [۲۰]. نکته‌ی جالب توجه این است که با اشباع شدن سطح نانومیلها از پروتئین و پوشیده شدن تمام سطح نانومیلها از

سلولهای مرده در محیط قرار دارند و این احتمال می‌رود که با گذشت زمان سلولهای مرده لیز شده و پروتئین‌های آن در محیط پخش می‌گردند و همین امر موجب ایجاد شرایط جدید در محیط می‌شود که در نهایت به یکسان شدن شرایط قبل و بعد از اصلاح نانومیلها در ۷۲ ساعت منجر می‌گردد. بنابراین برای بدست آوردن میزان دقیق مرگ سلولی بدنال مواجهه با نانومیلها (نه بدلیل بهم خوردگی شرایط زیستی) باید شرایط محیطی را ثابت نگه داشت. یکی از راههای ثابت شرایط زیستی می‌تواند تعویض محیط کشت و به عبارتی خارج کردن سلولهای مرده از محیط باشد بنابراین پیشنهاد می‌شود آزمایشات تکمیلی در این زمینه انجام گردد.

پوشش دار کردن نانومیلها راهی برای اتصال آنتی بادی‌ها و استفاده‌ی آنها در دارورسانی هدفمند و یا نشان دار کردن سلولها می‌باشد. در این میان پلی اتیلن گلیکول (PEG) و اوره از موادی هستند که در پوشش دهی نانو ساختارها استفاده می‌شوند. PEG پلیمری است که در فناوری نانو از آن به عنوان پوشش نانوذرات استفاده می‌شود. این ماده خاصیت ایمونوژنیک و آنتی ژنیک ندارد و به خوبی در آب قابل حل است [۳۱]. علاوه بر این مدت زمان ماندگاری طولانی در خون دارد و با بدن سازگار است [۳۵]. لذا با این پیش زمینه، ما در این مطالعه میزان سمیت نانومیل‌های اکسید آهن با روکش اوره و PEG را در دو فاز *In vitro* و *In vivo* مورد بررسی قرار دادیم.

در این مطالعه، زیست پذیری سلولها در مواجهه با نانومیل‌های پوشش داده شده با اوره بیشتر از نوع PEG آن بود. همانطور که ذکر شد، PEG پلیمری است که زیست سازگار بوده و مدت زمان حضور آن در خون بالاست [۳۵]. اما در این مطالعه بر خلاف انتظار، اثرات سمی آن در مقایسه با اوره بیشتر بود. میزان اثرات نانو ساختارها بر روی سلولها به غلظت آنها، نوع سلول مورد هدف، شکل و اندازه‌ی نانو ساختارها بستگی دارد. همچنین پروتئین‌های اطراف نانومیلها بدنال آگلو میزاسیون، شرایط زیستی سلولها را به مخاطره انداخته و باعث مرگ سلولها می‌شوند. در مواردی که آگلو میزاسیون نانومیلها ایجاد می‌شود و سپس رسوب می‌کنند، ممکن است منجر به کاهش ATP و سمیت سلول و یا مرگ آن شود [۳]. بنظر می‌رسد که نانومیل‌های حاضر نیز

آگلومره شده و منجر به بروز آثار سمی شده باشند. نتایج این مطالعه نشان داد که در مدت زمان طولانی مانند ۷۲ ساعت تفاوتی بین زیست پذیری سلولهای قرار گرفته در معرض نانومیل‌های دارای پوشش PEG و اوره دیده نمی‌شود. در حالیکه بعد از ۲۴ ساعت، آثار سمی ذرات دارای پوشش PEG بر سلولها مشهود بود. لذا بنظر می‌رسد که متغیر زمان در چگونگی اثر نانومیلها موثر می‌باشد. تا جایی که بررسی‌های ما نشان می‌دهد، در مورد اکسید آهن با پوشش اوره و اثرات آن بر سمیت یا زیست پذیری سلولی مطالعه ای انجام نشده است. این مطلب در مورد اثرات اکسید آهن با پوشش اوره بر عملکرد ارگانهای مانند کلیه و کبد در مطالعات حیوانی نیز صدق می‌کند. در مطالعه‌ای که اخیراً توسط Schweiger و همکارانش بر روی اکسید آهن انجام شده است، دو نوع پوشش PEI و PEGPEI مورد مطالعه قرار گرفته است. در این بررسی اکسید آهن با پوشش PEGPEI با دوز ۱۰ برابر، آثار سمی مشابه با اکسید آهن با پوشش PEI نشان داده است [۳۰]. در مطالعه‌ی دیگری که توسط Seo و همکارانش در سال ۲۰۰۸ بر روی اسید لینولئیک با پوشش PEG انجام داده است، ایمن بودن این ماده را در برابر سلولهای NIH 3T3 گزارش کرده‌اند در حالیکه اثرات سمی شدید همین ماده آپوپتوز را به میزان ۵ برابر در مواجهه با سلولهای سرطان پستان افزایش داده است [۳۲]. لذا باید این نکته‌ی مهم را در نظر داشت که نانو ذرات ممکن است بر روی سلول‌های طبیعی و غیر طبیعی مانند سلولهای سرطانی اثرات دوگانه اعمال کنند. در تایید اثرات متفاوت نانوذرات بر روی رده‌های مختلف سلولی، اخیراً تعدادی از دانشمندان در سال ۲۰۱۳ آثار میزان ثابتی از <sup>1</sup>(AmS-IONPs) را بر روی رده‌های سلولی نوروئی و bEnd.3 بررسی کرده‌اند. میزان زیست پذیری سلولهای نوروئی در مواجهه با دوز ثابتی از AmS-IONPs در حدود ۵۰٪ گزارش شده در حالیکه در شرایط یکسان زیست پذیری سلولهای bEnd.3 در حدود ۱۰۰٪ گزارش شده است [۳۳]. مطالعات دیگر نیز نتایجی مشابهی گزارش کرده‌اند، از جمله مشخص شده است که اثر نانوذرات هیالورونیک اسید با

1. Aminosilane-coated iron oxide nanoparticles

سرطانی افتراق قائل شد. همچنین ۱ ساعت و ۲۴ ساعت پس از تزریق نانومیلها، تغییر معنی‌داری در شاخص‌های عملکرد کلیه یعنی کراتینین و نیتروژن اوره خون نسبت به کنترل مشاهده نشد. اما میزان آهن سرم ۲۴ ساعت پس از تزریق افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۷). بنظر می‌رسد که بر خلاف ساعت اول پس از تزریق، ممکن است ظرف مدت زمان ۲۴ ساعت، آهن از زیر پوشش اوره آزاد شده باشد و منجر به افزایش غلظت آن در خون شده باشد. هر چند با افزایش سطح خونی آهن، ورود و رسوب آن در کبد و کلیه قابل انتظار است، اما با توجه به نتایج هیستوپاتولوژیک این مطالعه که در شکل ۹ نشان داده شده است، هیچگونه علائمی مبنی بر تغییر شکل، پارگی و چروکیدگی سلولهای کبدی و کلیوی، التهاب و یا هر نوع تغییر پاتولوژیک حاد دیگری مشاهده نشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نانومیلها استفاده شده در این تحقیق، جهت استفاده در موارد پزشکی مانند تصویربرداری و دارورسانی های کوتاه مدت ایمن می‌باشد. اما این موضوع در مورد اثرات دراز مدت آنها با همین غلظت و نیز اثر آنها بر روی سلولها و ارگانهای غیر طبیعی از جمله سرطان ممکن است صادق نباشد.

مطالعات نشان داده‌اند که متابولیسیم آهن سبب تخریب سطح<sup>۵</sup> (SPION) و به دنبال آن افزایش غلظت یون آهن و القاء استرس اکسیداتیو می‌شود [۳۶]. بر این اساس به نظر می‌رسد تزریق دوز بالای این ذرات از طریق استرس اکسیداتیو آسیب‌های گسترده ای را باعث شود [۱۸]. همانگونه که Jain و همکارانش (۲۰۰۸) نیز نشان داده‌اند، با تزریق دوز بالایی از SPIONs به میزان ۱۰mgFe/kg افزایش قابل توجهی در آنزیمهای کبدی، ۲۴ ساعت پس از تزریق دیده شده است [۱۰]. همچنین YanyunLv و همکاران در سال ۲۰۱۳، افزایش میزان مرگ سلولهای Hela (سلول سرطانی گردن رحم) را تحت تأثیر SPION گزارش کرده‌اند [۵]. بر اساس مطالعات موجود، نانوذرات سوپر پارامغناطیسی اکسید آهن آمیخته با سورافنیب (داروی ضد سرطان)، با و بدون پوشش فولات کاهش رشد سلولها را در نوع پوشش دار آن نشان داده اند [۳۷]. بنابراین نوع پوشش نانوذرات و مدت زمان

پوشش<sup>۱</sup> (PLGA) بر روی رده‌ی سلولی (CHO) با کاهش زیست پذیری سلولها همراه است [۳۴].

کبد و کلیه که در این مطالعه اثرات نانو ذرات اکسید آهن بر عملکرد آنها مورد بررسی قرار گرفت، دو اندام مهم هستند که نقش مهمی در دفع مواد زاید و متابولسیم ایفا می‌کنند. کبد در عملیات متفاوتی دخالت داشته و اندازه‌گیری مواد اولیه یا مواد حاصله از عملیات کبدی می‌تواند نشان دهنده کارکرد کبد باشد. در ارتباط با این دو اندام، از بین آزمایش‌های متعدد، چند آزمایش به طور استاندارد پذیرفته شده است. از بین آنزیمهای متعدد کبدی سه آنزیم برای بررسی کارکرد کبد مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. دو آنزیم<sup>۲</sup> ALT و<sup>۳</sup> AST در داخل سلول و دیگری<sup>۴</sup> ALP در غشا سلول قرار دارند. در اثر از بین رفتن سلول کبدی این آنزیمها در خون رها می‌شوند. بنابراین بالا رفتن این آنزیمها نشانه‌ای از تخریب سلولهای کبدی است. اولین گام در تشخیص آسیب کبدی، انجام آزمایش ساده خون است که حضور آنزیمهای کبدی مشخص را در خون نشان می‌دهد. تحت شرایط عادی این آنزیمها درون سلولهای کبدی وجود دارند اما زمانی که کبد آسیب می‌بیند این آنزیمها وارد جریان خون می‌شوند. کلیه‌ها، وظیفه پاکسازی برخی از مواد زاید و سمی که حاصل متابولیسیم می‌باشند را بر عهده دارند. تستهای عملکرد کلیه، قدرت دفع این مواد را توسط کلیه‌ها مورد ارزیابی قرار می‌دهد. آزمایش کراتینین خون همراه با نیتروژن اوره خون نیز جهت بررسی عملکرد کلیه مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده، تغییری در آنزیمهای کبدی ALT، AST و ALP در ۱ و ۲۴ ساعت پس از تزریق نانو میله های اکسید آهن دیده نشد (شکل ۶). این نتیجه نشاندهنده‌ی عدم آسیب کبدی تحت تأثیر نانوذرات آهن به صورت حاد است. البته باید توجه داشت که ممکن است اثرات نانو ذرات در دراز مدت تظاهر پیدا کند. ضمن اینکه مجدداً شایسته‌ی یاد آوری است که بایستی بین اثرات نانو ذرات بر روی سلولهای طبیعی و در حیوان طبیعی با اثرات آن بر روی سلولهای غیر طبیعی مثلاً سلولهای

1. poly(lactic-co-glycolic acid)
2. Alanine aminotransferase
3. Aspartate Aminotransferase
4. Alkaline phosphatase

5. Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles

گزارش شده است. این تفاوت می‌تواند به علت پروتئین‌های جذب شده به سطح نانومیلها و پوشش آنها باشد [۳۶]. ضمن اینکه نوع پوشش سطحی در میزان ماندگاری آن در خون و ایمن بودن آن تأثیر دارد، از جمله پلی اتیلن گلیکول و PVA افزایش ایمنی نانومیل‌های آهن را در پی داشته است [۲۲]. بنابراین جهت تعیین دقیق نقش اوره در ایمنی این نانومیل‌ها، پیشنهاد می‌شود آزمایشات کاملتری برای مشخص شدن نوع پروتئین‌های جذب شده به نانومیل‌ها و میزان ماندگاری آن در خون در طیف گسترده ای از دوز و زمان انجام گیرد.

### سیاسگزاری

این مقاله برگرفته از نتایج پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی می‌باشد. از معاونت محترم تحقیقات فناوری دانشگاه علوم پزشکی زنجان جهت تأمین هزینه‌های این پژوهش سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از همکاری مسئولین محترم انستیتو پاستور ایران به جهت فراهم آوردن امکانات لازم تشکر می‌شود. راهنمایی و نظرات ارزنده‌ی جناب آقای دکتر مرتضی محمودی شایسته‌ی قدردانی است.

تأثیر آن می‌تواند به عنوان فاکتورهای تأثیرگذار بر چگونگی عملکرد آنها با توجه به وضعیت سلول یا سیستم بیولوژیک مورد نظر قرار گیرند. در این مطالعه، عدم پیدایش تغییرات هیستوپاتولوژیک در کلیه و کبد موش ممکن است ناشی از شکل نانو ذره در ارتباط با نوع اندام باشد. در همین راستا، در مقایسه‌ای که توسط park و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در مورد نانومیل‌های میله‌ای شکل و کروی شکل اکسید آهن انجام شده است، درصد تجمع نانومیل‌های میله‌ای شکل در کلیه کمتر از نانومیل‌های کروی ذکر شده است در حالیکه نسبت تجمع نانو لوله‌ها در طحال نسبت به کبد بیشتر بوده است. این مطلب موید این است که تجمع نانومیل‌ها، علاوه بر شکل آنها به نوع اندام نیز بستگی دارد [۲۶]. علاوه بر این، پیش بینی آثار بیولوژیکی نانومیل‌ها بستگی به میزان و نوع پروتئین‌های جذب شده به سطح آنها دارد [۱۹] بطور مثال نشان داده شده است که، ۵۵٪ از دوز تزریقی (داخل سیاهرگی) نانومیل‌های دارای پوشش اولئیک اسید-پلورونیک در کبد موش تجمع پیدا می‌کند در حالیکه ۲۵٪ دوز تزریقی نانومیل‌های دارای پوشش دکستران از طریق ادرار و مدفوع دفع می‌شود که این درصد در مدل حیوانی دیگر ۲۰٪ نیز

nanocarrier fortargeted delivery of evodiamine with enhanced antitumor efficacy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 110 (2013) 411-418.

## References

- [1] Albornoz C, Jacobo S E. Preparation of a biocompatible magnetic film from an aqueous ferrofluid, *J Magn Magn Mater* 305 (2006) 12-15.
- [2] Almeida JP, Chen AL, Foster A, Drezek R, In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)* 6 (2011) 815-835.
- [3] AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveettil S, Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3 (2009) 279-290.
- [4] Derfus A. M, Chan W. C. W, Bhatia S N, Intracellular Delivery of Quantum Dots for Live Cell Labeling and Organelle Tracking. *Advanced Materials* 16 (2004) 961-966.
- [5] Efficacy Y, Guobin D, Jinghui Z, Guoa Y, Nieb G, Xua L, A superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-loaded polymeric nanocarrier fortargeted delivery of evodiamine with enhanced antitumor efficacy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 110 (2013) 411-418.
- [6] Foley S, Crowley C, Smaih M, Bonfils C, Erlanger B F, Seta P, Larroque C, Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 294 (2002) 116-119.
- [7] Freshney RI, *Culture of Animal Cell A manual of basic technique*. Wiley & sons. sixth ed. New york city. NYSE: JWA, 2010, p. 365-381.
- [8] Guo P, Coban O, Snead N M, Trebley J, Hoeprich S, Guo S and Shu Y, Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. *Adv Drug Deliv Rev* 62 (2010) 650-666.
- [9] Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA, Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Acc Chem Res* 41 (2008) 1578-1586.

- [10] Jain TK, Reddy MK, Morales MA, Leslie-Pelecky DL, Labhassetwar V, Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Molecular Pharmaceutics* 5 (2008) 316-327.
- [11] Javier P, Rodríguez-Pedreira M, Zhang F, Gil PR, Loretta L, Parak W J, One example on how colloidal nano- and microparticles could contribute to medicine. *Nanomedicine (Lond)* 4 (2009) 967-979.
- [12] Kang H W, Josephson L, Petrovsky A, Weissleder R, Bogdanov A, Magnetic resonance imaging of inducible E-selectin expression in human endothelial cell culture. *Bioconjugate Chemistry* 13 (2002) 122-127.
- [13] Khor E, Lim L Y, Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 24 (2003) 2339-2349.
- [14] Kumari M, Rajak S, Singh S P, Murty U S, Mahboob M, Grover P, Rahman M F, Biochemical alterations induced by acute oral doses of iron oxide nanoparticles in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol* 36 (2013) 296-305.
- [15] Latham V H, Ducut J L, Rostamiani K, Chun H H, Lopez M E, Herrera S, Oppenheimer S B, A Rapid Lectin Receptor-Binding Assay-Comparative-Evaluation of Sea-Urchin Embryo Cell-Surface Lectin Receptors. *Acta Histochemica* 97 (1995) 89-97.
- [16] Longo Dan L, editor, *Harrison's principles of internal medicine*. 18<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, (2012).
- [17] Mahmoudi M, Azadmanesh K, Shokrgozar MA, Journeay WS, Laurent S, Effect of nanoparticles on the cell life cycle. *Chem Rev* 111 (2011) 3407-3432.
- [18] Mahmoudi M, Hofmann H, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A, Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chem Rev* 112 (2012) 2323-2338.
- [19] Mahmoudi M, Lynch I, Ejtehadi MR, Monopoli MP, Bombelli FB, Laurent S, Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem Rev* 111 (2011) 5610-5637.
- [20] Mahmoudi M, Simchi A, Imani M, Milani AS, Stroeve P, An in vitro study of bare and poly(ethylene glycol)-co-fumarate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a new toxicity identification procedure. *Nanotechnology* 20 (2009) 225104.
- [21] Mahmoudi M, Simchi A, Imani M, Shokrgozar MA, Milani AS, Hafeli UO, Stroeve P, A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 75 (2010) 300-309.
- [22] Mahmoudi M, Simchi A, Vali H, Imani M, Shokrgozar M A, Azadmanesh K, Azari F, Cytotoxicity and Cell Cycle Effects of Bare and Poly(vinyl alcohol)-Coated Iron Oxide Nanoparticles in Mouse Fibroblasts. *Adv Eng Mater* 11 (2009) B243-B250.
- [23] Mao H Y, Laurent S, Chen W, Akhavan O, Imani M, Ashkarran AA, Mahmoudi M, Graphene: promises, facts, opportunities, and challenges in nanomedicine. *Chem Rev* 113 (2013) 3407-3424.
- [24] Marzieh Kh, Mahnaz K, Lotfollah Kh, Hossein NV, Comparison of the effect of iron oxide nanoparticles and bulk on the memory and associated alterations in dopamine and serotonin levels in the hippocampus of adult male rats. *Physiol Pharmacol* 17 (2013) 204-215.
- [25] Massia SP, Stark J, Letbetter DS, Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. *Biomaterials* 21 (2000) 2253-2261.
- [26] Park JH, von Maltzahn G, Zhang L, Derfus AM, Simberg D, Harris T J, Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor M J, Systematic surface engineering of magnetic nanoworms for in vivo tumor targeting. *Small* 5 (2009) 694-700.
- [27] Romero EL, Morilla MJ, Nanotechnological approaches against Chagas disease. *Adv Drug Deliv Rev* 62 (2010) 576-588.
- [28] Ros PR, Freeny PC, Harms SE, Seltzer SE, Davis P L, Chan TW, Stillman AE, Muroff LR, Runge VM, Nissenbaum MA, Hepatic MR Imaging with Ferumoxides: A Multicenter Clinical Trial of the Safety and Efficacy in the Detection of Focal Hepatic Lesions. *Radiology* 196 (1996) 481-488.
- [29] Rouch DA, Lee BT, Morby AP, Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *J Ind Microbiol* 14 (1995) 132-141.
- [30] 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* 408 (2011) 130-137.
- [31] Seo H, Moon H, Guo DD, Lee H, Choi Y, Cho C, PEGylation of Conjugated Linoleic Acid and its Application as an Anti-Cancer Prodrug. *Key Eng Mat*

- 342-343 (2007) 441-444.
- [32] Seo JH, Moon HS, Kim IY, Guo DD, Lee HG, Choi YJ, Cho CS, PEGylated conjugated linoleic acid stimulation of apoptosis via a p53-mediated signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Eur J Pharm Biopharm* 70 (2008) 621-626.
- [33] Sun Z, Yathindranath V, Worden M, Thliveris JA, Chu S, Parkinson FE, Hegmann T, Miller DW, Characterization of cellular uptake and toxicity of aminosilane-coated iron oxide nanoparticles with different charges in central nervous system relevant cell culture models. *Int J Nanomedicine* 8 (2013) 961-970.
- [34] Vangara KK, Liu JL, Palakurthi S, Hyaluronic Acid-decorated PLGA-PEG Nanoparticles for Targeted Delivery of SN-38 to Ovarian Cancer. *Anticancer Res* 33 (2013) 2425-2434.
- [35] Veronese FM, Pasut G, PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 10 (2005) 1451-1458.
- [36] Weissleder R, Stark DD, Engelstad BL, Bacon BR, Compton CC, White DL, Jacobs P, Lewis J, Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am J Roentgenol* 152 (1989) 167-173.
- [37] Zhang L, Gong F, Zhang F, Ma J, Zhang P, Shen J, Targeted therapy for human hepatic carcinoma cells using folate-functionalized polymeric micelles loaded with superparamagnetic iron oxide and sorafenib in vitro. *Int J Nanomedicine* 8 (2013) 1517-1524.