

اثر نانوذرات اکسید آهن و یون آهن بر کار آیی تولید مثلی موش‌های سوری باردار و رشد شناسی عصبی-رفتاری زاده‌ها

فرشته عنبریان (MSc)^۱، سید رضا فاطمی طباطبایی (PhD)^{*}، ایرج کاظمی نژاد (PhD)^۲، صدیقه محمدیان (MSc)^۱

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۲- دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز

دریافت: ۹۴/۱/۲۰، اصلاح: ۹۴/۵/۷، پذیرش: ۹۴/۷/۶

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به حساسیت بالای رویان و جنین به عوامل سمی و افزایش استفاده از نانو مواد مختلف از جمله نانواکسید آهن در پزشکی، در این مطالعه اثرات نانواکسید آهن و یون آهن بر شاخص‌های تولیدمثلی موش‌های سوری باردار و تکامل بازتاب‌های عصبی-رفتاری نوزادان آنها مورد بررسی قرار گرفت.
مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۴۹ سر موش سوری ماده در گروه‌های کنترل، نانواکسید آهن ۱۰۰، نانواکسید آهن ۱۰۰۰ و یون آهن ۱۰۰۰ از چهار روز قبل از جفت‌اندازی تا زمان زایمان یک روز درمیان به صورت زیرجلدی به ترتیب با دوزهای صفر، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم نانواکسید آهن و یون فریک (معادل با مقدار یون موجود در ۱۰۰۰ میکروگرم نانواکسید آهن) تیمار شدند. شاخص‌های تولیدمثلی مادران، رشدشناسی عصبی رفتاری و تکامل فیزیکی نوزادان به تفکیک جنسیت ارزیابی و زمان تکاملشان بر حسب روز مشخص شد.

یافته‌ها: تکامل بسیاری از بازتاب‌های عصبی رفتاری و شاخص‌های تکامل فیزیکی خصوصاً در گروه نانواکسید آهن ۱۰۰۰ در مقایسه با گروه کنترل دچار تاخیر شد. به عنوان مثال امتناع از پرتگاه (۱/۱۳±۰/۱۳؛ ۲/۷۰±۰/۱۳؛ $p<0/001$)، چسبیدن به سطح (۲/۵۵±۰/۲۰؛ ۳/۴۵±۰/۲۰؛ $p<0/01$)، سطح شیبدار (۲/۶۰±۰/۲۲؛ ۳/۵۰±۰/۲۲؛ $p<0/01$)، گرفتن میله (۵/۸۵±۰/۴۴؛ ۷/۳۰±۰/۴۴؛ $p<0/05$)، دویدن (۷/۷۵±۰/۲۳؛ ۸/۷۰±۰/۲۳؛ $p<0/01$)، در آمدن کرک (۵/۹۰±۰/۱۸؛ ۶/۸۵±۰/۱۸؛ $p<0/001$)، باز شدن چشم (۱۴/۲۵±۰/۲۲؛ ۱۵/۲۵±۰/۲۲؛ $p<0/01$) و نزول بیضه (۲/۱۲±۰/۱۸؛ ۲/۲۴±۰/۱۸؛ $p<0/001$) توسط دوز بالای نانواکسید آهن در قیاس با گروه کنترل دچار تاخیر شدند. شدت این تاخیرها در اکثر موارد به ترتیب در گروه‌های نانواکسید آهن ۱۰۰ و یون آهن کمتر بود.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه بیانگر عوارض شدید مواجهه با نانوذرات اکسید آهن در دوران جنینی و سمی‌تر بودن آن در مقایسه با یون آهن می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: نانواکسید آهن، دوران قبل از تولد، دوران نوزادی، رشدشناسی عصبی رفتاری.

مقدمه

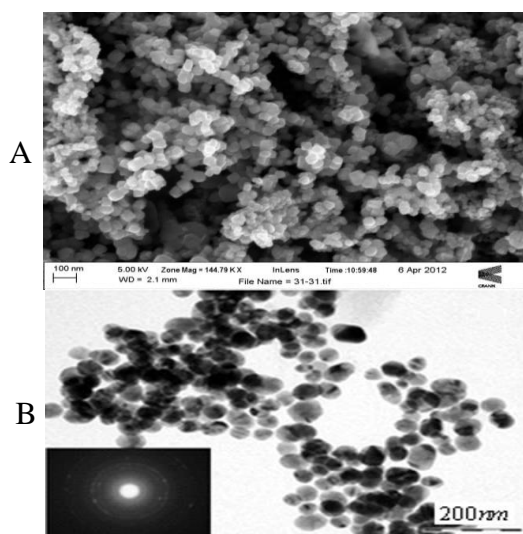
عبور راحتتر آنها از سد خونی مغزی کمک می‌کند (۴). از جمله نانو مواد مهم می‌توان به نانو ذرات اکسید آهن اشاره کرد که دارای کاربردهای زیست پزشکی زیادی از قبیل بازسازی بافتی، ایمنی‌سنجی، رفع مسمومیت مایعات زیستی، گرمادرمانی سلول‌های سرطانی و غیره می‌باشند (۵). مطالعات متعددی انتقال نانوذرات از جفت را مورد بررسی قرار داده‌اند (۸-۶). به نظر می‌رسد نانوذرات به علت اندازه فوق العاده کوچک خود با مشکل چندانی برای عبور از سد‌های فیزیولوژیک مواجه نیستند و بنابراین به طور موثر از طریق جریان خون در بافت‌های بدن توزیع می‌گردند (۱۰ و ۹). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که نانوذرات می‌توانند از جفت عبور کنند همچنین آنها در جفت، کبد و مغز جنین در پی تزریق

فناوری نانو از جمله تکنولوژی‌های رو به گسترش و مورد توجه و از مهمترین دستاوردهای علمی بوده و تأثیر مثبتی در ارتقاء زندگی، تولیدات جدید و تولید محصولات ارزان‌تر دارد (۱). در دهه گذشته، فناوری نانو به طور گسترده برای استفاده در پزشکی از جمله کشفیات بیولوژیک، انتقال دارو، تصویربرداری تشخیصی و مهندسی بافت مطرح شده است (۳ و ۲). نانو داروها در قیاس با داروهای معمولی خلوص، جذب، و اثر بیشتری دارند، برای رسیدن به بافت هدف انتخابی‌تر عمل کرده، و بنابراین در مقادیر و دفعات کمتر استفاده می‌شوند. در واقع خصوصیت مهم نانو داروها بالاتر بودن نسبت سطح به حجم آنها در مقایسه با داروهای معمولی است که این افزایش نسبی، به افزایش حلالیت، سرعت جذب و

این مقاله حاصل پایان نامه فرشته عنبریان دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی دانشگاه شهید چمران اهواز می‌باشد.

*مسئول مقاله: دکتر سید رضا فاطمی طباطبایی

آدرس: اهواز، دانشگاه شهید چمران، دانشکده دامپزشکی، گروه فیزیولوژی. تلفن: ۰۶۱-۳۳۳۳۰۰۱-۱۹



شکل ۱. (A) تصویر SEM نانوذرات اکسید آهن تهیه شده به روش الکترواکسیداسیون، (B) تصویر TEM نانوذرات اکسید آهن تهیه شده به روش الکترواکسیداسیون

گروه بندی: موش‌ها به صورت تصادفی در چهار گروه (حداقل ۱۰ موش در هر گروه) شامل گروه‌های کنترل، نانو اکسید آهن ۱۰۰، نانو اکسید آهن ۱۰۰۰ و یون آهن ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم قرار گرفتند و از چهار روز قبل از مجاور شدن با حیوان نر تا زمان زایمان یک روز در میان به ترتیب صفر، ۱۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم نانو اکسید آهن و یون آهن فریک (نونفر، شرکت دانا مد پارس، سویس) را به مقداری که یون دریافتی در این گروه برابر با آهن موجود در ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم نانو اکسید آهن باشد به صورت زیر جلدی دریافت کردند. این دوزها بر اساس یک آزمایش مقدماتی انتخاب شد که در آن دوزهای ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم نانو اکسید آهن به صورت زیر جلدی به موش‌های بارداری تزریق و دوزهای ۱۰۰ و ۱۰۰۰ که باعث بروز ناهنجاری‌های ظاهری در زاده‌ها نشدند انتخاب شد. متغیرهای مورد بررسی در این مطالعه شامل سنجش‌ها و آزمون‌هایی بود که شاخص‌های تولیدمثلی مادر، تکامل عصبی رفتاری و تکامل فیزیکی زاده‌ها را مورد بررسی قرار داد. وزن موش‌های ماده در طول دوره بارداری و دوره شیرواری و وزن کلنی نوزادان در روزهای ۱، ۴، ۷، ۱۴ و روز از شیرگیری (روز ۲۱) بعد از تولد ثبت شد. در دوره شیرواری آزمون‌هایی که معرف رشد و تکامل رفلکس‌ها و عملکرد عصبی- رفتاری زاده‌ها بودند، انجام شد تا اثر مواد تجویز شده بر رشد فیزیکی و رفتار زاده‌ها مشخص شود. در روز چهارم، قبل از توزین کلنی نوزادان، به منظور یکتواخت نمودن شرایط کلنی‌ها، حداکثر هشت نوزاد از هر کلنی باقی ماند و سایر نوزادان حذف شدند (۲۳). همچنین رفتار بچه‌خواری مادران با مقایسه تعداد نوزادان در روزهای متوالی ثبت شد. شاخص‌های تولیدمثلی شامل فاصله جفت‌اندازی تا زایمان (تعداد روزهای سپری شده از زمان مجاور شدن حیوان نر و ماده تا روز زایمان)، شاخص بارداری (تعداد ماده‌های باردار با نوزاد زنده در روز ۱ بخش بر تعداد کل ماده‌ها)، نسبت زنده‌مانی نوزادان (تعداد نوزادان زنده مانده در روز ۴ بخش بر تعداد کل نوزادان زنده متولد شده)، نسبت جنسی نوزادان (نسبت تعداد نوزادان نر به کل نوزادان)، وزن کلنی و میانگین وزن هر نوزاد در روز اول و تعداد نوزاد متولد شده در هر کلنی مورد

داخل رگی در موش‌های باردار پیدا شده‌اند (۱۱). مصرف موادی که توانایی عبور از جفت را در طی بارداری دارند می‌تواند بر بیان ژن‌هایی که نقش کلیدی در نمو عصبی دارند موثر بوده، که در نهایت منجر به اختلال ناقلین عصبی و به تبع آن رفتاری شوند (۱۲). نانوذرات اکسید آهن توانایی عبور از سد خونی-جفتی و نفوذ به جنین در حال تکوین را دارند بنابراین ممکن است باعث بروز اختلالاتی پس از تولد شوند (۱۳). برخی از نانومواد اثرات زیان‌آوری بر تکامل جنینی می‌گذارند و این اثرات زیان‌آور، متأثر از ترکیبات نانومواد، تغییرات سطح، دوز، راه‌های ورود و گونه‌های حیوانی هستند (۱۴). نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4) دارای اثرات سمی قابل توجهی از جمله، التهاب بافت، مرگ سلول، استرس اکسیداتیو (۱۵)، تخریب میتوکندری، تغییر پروتئین‌ها (۱۶)، تخریب DNA و تراکم کروموزوم (۱۷) هستند. نانوذرات اکسید آهن دارای اثرات سیتوتوکسیک روی سلول‌های بنیادین جنین موش (۱۸)، سیستم تنفسی و ایمنی (۱۹) هستند.

همچنین گزارشاتی در مورد ایجاد استرس اکسیداتیو (۲۰) و تخریب حافظه احترازی غیرفعال (۲۱) توسط نانو ذرات اکسید آهن وجود دارد. در مورد اثر نانوذرات اکسید آهن بر تولید مثل مطالعات بسیار محدود است و هیچگونه مطالعه‌ای در خصوص تکامل عصبی-رفتاری زاده‌ها پس از مواجهه مادران باردار با نانوذرات آهن صورت نگرفته است. تجویز نانوذرات اکسید آهن در روز ۹ تا ۱۹ بارداری موش باعث افزایش بچه خواری و کاهش وزن مادران و تجمع نانوذرات در کبد جنین‌ها می‌شود (۲۲). علاوه، مواجهه موش‌های باردار با این نانوذرات باعث کاهش تعداد اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت I و اسپرماتید در بیضه زاده‌های ۶۰ تا ۷۰ روزه آنها شد (۱۳). با توجه به استفاده روزافزون از نانوذرات اکسید آهن و عدم دستیابی به گزارشی در مورد اثرات مواجهه جنینی با آن و تأثیر آن بر تولید مثل مادر و تکامل جنین، این مطالعه به منظور بررسی اثر تجویز مکرر زیرجلدی نانو ذرات اکسید آهن و یون آهن بر شاخص‌های تولیدمثلی مادران باردار و تکامل بازتاب‌های عصبی رفتاری نوزادان آنها در دوران شیرخواری انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نانو اکسید آهن: نانو اکسید آهن (Fe_3O_4) به روش الکترواکسیداسیون در گروه فیزیک دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه و فاز و اندازه آنها به ترتیب با استفاده از آنالیز پراش پرتو X و میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد مطالعه قرار گرفت.

حیوانات: در این پژوهش تجربی ۴۹ سر موش سوری ماده نژاد NMRI (28 ± 3 گرم) از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی اهواز تهیه و در قفس‌های پلکسی‌گلاس، دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، ۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. دسترسی حیوانات به آب و غذای فشرده (شرکت خوراک دام پارس تهران) بدون محدودیت بود. پس از دو هفته تطابق، هر چهار موش ماده به همراه یک نر در یک قفس قرار گرفتند. موش‌های نر، بیش از دو دوره سیکل استروس موش‌های ماده یعنی بعد از ۱۴ روز از قفس موش‌های ماده جدا شدند. انتخاب دوره ۱۴ روزه به خاطر اطمینان از انجام جفت‌گیری موفق بود. موش‌های ماده در روز ۱۷ پس از جفت‌گیری به قفس‌های انفرادی مناسب موش سوری انتقال داده شدند. بررسی‌ها از ساعت ۸ صبح تا ۱۴ بعد از ظهر انجام شد.

گروه دریافت کننده نانو اکسید آهن ۱۰۰۰ و یون آهن به ترتیب با مقادیر (۲۴/۷۲±۰/۲۴، ۶/۹۰±۰/۰۱) (p<۰/۰۱) و در ۱۰۰٪ همین بازتاب در هر سه گروه نانو اکسید آهن ۱۰۰ و ۱۰۰۰ و یون آهن به ترتیب با مقادیر (۸/۷۰±۰/۲۳، ۸/۴۰±۰/۲۳) (p<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل (۵/۸۵±۰/۲۴) (p<۰/۰۱)؛ ۱۰۰٪ (۷/۷۵±۰/۲۳) (p<۰/۰۵) تاخیر مشاهده شد (جدول ۳). تمام آزمون‌ها به تفکیک جنسیت انجام شد اما هیچ تفاوت معنی داری بین حیوانات نر و ماده دیده نشد و جنسیت تأثیری بر بازتاب‌های رخ داده در گروه‌های مختلف نداشت.

در ۱۰۰٪ شاخص تکامل فیزیکی در آمدن کرک گروه دریافت کننده نانو اکسید آهن ۱۰۰۰ با مقدار (۶/۸۵±۰/۱۸) در مقایسه با گروه کنترل

گروه دریافت کننده نانو اکسید آهن ۱۰۰۰ و یون آهن به ترتیب با مقادیر (۲۳/۲±۰/۷۵، ۲۳/۵±۰/۷۵) (p<۰/۰۱) و در ۱۰۰٪ همین بازتاب در هر سه گروه نانو اکسید آهن ۱۰۰ و ۱۰۰۰ و یون آهن به ترتیب با مقادیر (۱/۸۳±۰/۰۷، ۱/۷۱±۰/۰۷) (p<۰/۰۱)؛ ۱۰۰٪ (۱/۸۳±۰/۰۷) تاخیر مشاهده شد (جدول ۴). تمام این آزمون‌ها نیز به تفکیک جنسیت انجام شد اما هیچ تفاوت معنی داری بین حیوانات نر و ماده دیده نشد و جنسیت تأثیری بر تکامل شاخص‌های فیزیکی در گروه‌های مختلف نداشت.

جدول ۲. مقایسه اثر نانو اکسید آهن و یون آهن بر شاخص‌های تولید مثلی مادران

| شاخص های تولید مثلی | کنترل Mean±SD | نانو اکسید آهن ۱۰۰ Mean±SD | نانو اکسید آهن ۱۰۰۰ Mean±SD | آهن ۱۰۰۰ Mean±SD |
|--|------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| تعداد موش ماده مورد استفاده برای جفتگیری | ۱۰ | ۱۴ | ۱۵ | ۱۰ |
| فاصله جفت‌گیری تا زایمان | ۲۳/۲±۰/۷۵ | ۲۳/۵±۰/۷۵ | ۲۴±۰/۷۵ | ۲۳/۹±۰/۷۵ |
| \$ شاخص بارداری | ۱ | ۰/۷۱ | ۰/۶۷ | ۱ |
| نسبت زنده مانی نوزادان | ##۱±۰/۰۳ | #۰/۹۸±۰/۰۳ | **۰/۸۹±۰/۰۳ | ###۰/۹۹±۰/۰۳ |
| نسبت جنسی نوزادان | ۰/۵۳±۰/۰۳ | ۰/۵۴±۰/۰۳ | ۰/۴۴±۰/۰۳ | ۰/۵۲±۰/۰۳ |
| وزن کلنی در یک روزگی | ۱۹±۱/۲۲ | ۱۷/۵±۱/۲۲ | ۱۶/۹±۱/۲۲ | ۱۸/۵±۱/۲۲ |
| میانگین وزن نوزادان در ۱ روزگی | ۱/۸۳±۰/۰۷ | ۱/۷۷±۰/۰۷ | ۱/۷۱±۰/۰۷ | ۱/۸۳±۰/۰۷ |
| تعداد زاده ها | ۱۰/۳±۰/۵۶ | ۹/۹±۰/۵۶ | ۱۰±۰/۵۶ | ۱۰/۱±۰/۵۶ |

گروه‌های کنترل، نانو اکسید آهن (۱۰۰ و ۱۰۰۰) به ترتیب صفر، (۱۰۰۰ μg/kg، ۱۰۰ μg/kg) و گروه آهن (۱۰۰۰ μg/kg) یون آهن را یک روز در میان در طی دوران جفتگیری و بارداری دریافت کردند. *: اختلاف معنی دار با گروه کنترل (p<۰/۰۱)؛ #: اختلاف معنی دار با گروه نانو اکسید آهن ۱۰۰۰ (p<۰/۰۵)؛ ##: از آنجاییکه این شاخص حاصل تقسیم تعداد مادران زایمان کرده بر کل مادران است، برای کل گروه فقط یک عدد به دست می‌آید و بنابراین امکان بررسی آماری ندارد.

جدول ۳. مقایسه اثر نانو اکسید آهن و یون آهن بر حسب روز در بر تکمیل بازتاب‌های عصبی رفتاری در ۵۰٪ و ۱۰۰٪ درصد از نوزادان هر گروه

| بازتاب | کنترل Mean±SD | نانو اکسید آهن ۱۰۰ Mean±SD | نانو اکسید آهن ۱۰۰۰ Mean±SD | آهن ۱۰۰۰ Mean±SD |
|--|------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| قرار گرفتن روی اندامها در سطح ۵۰٪ | ۲/۱۵±۰/۳۱ | ۲/۱۰±۰/۳۱ | ۲/۱۵±۰/۳۱ | ۱/۵۵±۰/۳۱ |
| قرار گرفتن روی اندامها در سطح ۱۰۰٪ | ۴/۴±۰/۴۶ | ۳/۳۵±۰/۴۶ | ۳/۴۵±۰/۴۶ | ۲/۸±۰/۴۶ |
| امتناع از پرتگاه ۵۰٪ | ##۱/۰۵±۰/۰۹ | *۱/۴±۰/۰۹ | **۱/۶±۰/۰۹ | #۱/۱۵±۰/۰۹ |
| امتناع از پرتگاه ۱۰۰٪ | ###۱/۳۵±۰/۱۳ | ***۲/۱۵±۰/۱۳ | ***۲/۷±۰/۱۳ | ###۱/۴۵±۰/۱۳ |
| حرکت مارپیچ ۵۰٪ | #۴/۰۵±۰/۳۰ | #۴/۶۵±۰/۳۰ | **۵/۵±۰/۳۰ | #۴/۴±۰/۳۰ |
| حرکت مارپیچ ۱۰۰٪ | ۶/۲۵±۰/۲۸ | ۶±۰/۲۸ | ۶/۹۵±۰/۲۸ | ۶/۴۵±۰/۲۸ |
| چسبیدن به سطح ۵۰٪ | ۱/۴۵±۰/۱۲ | ۱/۵±۰/۱۲ | ۱/۴۵±۰/۱۲ | ۱/۲۵±۰/۱۲ |
| چسبیدن به سطح ۱۰۰٪ | ##۲/۵۵±۰/۲۰ | #۲/۷۵±۰/۲۰ | **۲/۴۵±۰/۲۰ | ##۲/۵۵±۰/۲۰ |
| سطح شیدار ۵۰٪ | ##۱/۴۵±۰/۱۳ | *۱/۸۵±۰/۱۳ | **۲/۳±۰/۱۳ | ##۱/۴±۰/۱۳ |
| سطح شیدار ۱۰۰٪ | ##۲/۶±۰/۲۲ | *۲/۴±۰/۲۲ | **۲/۵±۰/۲۲ | ##۲/۶±۰/۲۲ |
| گرفتن میله ۵۰٪ | ۵±۰/۳۴ | ۵/۶±۰/۳۴ | ۵/۷۵±۰/۳۴ | ۵/۶±۰/۳۴ |
| گرفتن میله ۱۰۰٪ | #۵/۸۵±۰/۴۴ | *۷/۸۵±۰/۴۴ | *۷/۳±۰/۴۴ | ۶/۲±۰/۴۴ |
| بازتاب سیلیک ۵۰٪ | ۱/۱۵±۰/۰۹ | ۱/۱۵±۰/۰۹ | ۱/۲±۰/۰۹ | ۱/۱۵±۰/۰۹ |
| بازتاب سیلیک ۱۰۰٪ | ۱/۷۵±۰/۱۵ | ۲/۱±۰/۱۵ | ۲/۲±۰/۱۵ | ۱/۹±۰/۱۵ |
| قرار گرفتن روی اندامها پس از سقوط ۵۰٪ | ۹/۸۵±۰/۱۵ | ۹±۰/۱۵ | ۱۰/۴۵±۰/۱۵ | ۹/۶۵±۰/۱۵ |
| قرار گرفتن روی اندامها پس از سقوط ۱۰۰٪ | ۱۱/۷±۰/۴۰ | ##۱۰/۹±۰/۴۰ | ۱۲/۵۵±۰/۴۰ | #۱۱/۳±۰/۴۰ |
| دویدن ۵۰٪ | ###۵/۸۵±۰/۲۴ | #۶/۳۵±۰/۲۴ | **۷/۲±۰/۲۴ | *۶/۹±۰/۲۴ |
| دویدن ۱۰۰٪ | ##۷/۷۵±۰/۲۳ | *۸/۴±۰/۲۳ | **۸/۷±۰/۲۳ | *۸/۴±۰/۲۳ |

جدول ۴. مقایسه اثر نانو اکسید آهن و یون آهن بر تکامل شاخص های فیزیکی بر حسب روز در ۵۰٪ و ۱۰۰٪ از نوزادان هر گروه

| شاخص تکامل فیزیکی | کنترل | نانو اکسید آهن ۱۰۰ | نانو اکسید آهن ۱۰۰۰ | آهن ۱۰۰۰ |
|-----------------------------|--------------|--------------------|---------------------|--------------|
| | Mean(SD) | Mean(SD) | Mean(SD) | Mean(SD) |
| جداشدن لاله گوش از بدن ۵۰٪ | ۳/۷±۰/۱۴ | ۴±۰/۱۴ | ۳/۷±۰/۱۴ | ۴/۱±۰/۱۴ |
| جداشدن لاله گوش از بدن ۱۰۰٪ | ۴/۳±۰/۱۶ | ۴/۱۵±۰/۱۶ | ۳/۹±۰/۱۶ | ۴/۴±۰/۱۶ |
| درآمدن کرک ۵۰٪ | ۵/۸±۰/۱۷ | ۵/۸±۰/۱۷ | ۶/۳۵±۰/۱۷ | ۶/۱±۰/۱۷ |
| درآمدن کرک ۱۰۰٪ | ###۵/۹±۰/۱۸ | ##۶/۲±۰/۱۸ | ***۶/۸۵±۰/۱۸ | ##۶/۱±۰/۱۸ |
| درآمدن دندان ثنایا ۵۰٪ | ۷/۱±۰/۲۴ | ۷/۴±۰/۲۴ | ۷/۳±۰/۲۴ | ۷/۲±۰/۲۴ |
| درآمدن دندان ثنایا ۱۰۰٪ | ۷/۱±۰/۲۴ | ۷/۴±۰/۲۴ | ۷/۳±۰/۲۴ | ۷/۲±۰/۲۴ |
| باز شدن چشم ۵۰٪ | #۱۳/۸±۰/۱۸ | *۱۴/۴±۰/۱۸ | *۱۴/۴۵±۰/۱۸ | **۱۵/۲±۰/۱۸ |
| باز شدن چشم ۱۰۰٪ | ##۱۴/۲۵±۰/۲۲ | *۱۴/۹۵±۰/۲۲ | **۱۵/۲۵±۰/۲۲ | **۱۵/۸۵±۰/۲۲ |
| باز شدن منفذ گوش ۵۰٪ | ۱۳/۱±۰/۳۴ | ۱۳/۲±۰/۳۴ | ۱۳/۲±۰/۳۴ | ۱۳/۸±۰/۳۴ |
| باز شدن منفذ گوش ۱۰۰٪ | ۱۳/۱±۰/۳۴ | ۱۳/۱±۰/۳۴ | ۱۳/۲±۰/۳۴ | ۱۳/۸±۰/۳۴ |
| نزول بیضه ۵۰٪ | ###۲۱/۲±۰/۱۸ | ###۲۰/۹۱±۰/۱۸ | **۲۲/۴±۰/۱۸ | ##۲۱/۸±۰/۱۸ |
| نزول بیضه ۱۰۰٪ | ###۲۱/۲±۰/۱۸ | ###۲۰/۹۱±۰/۱۸ | **۲۲/۴±۰/۱۸ | ##۲۱/۸±۰/۱۸ |

گروه های کنترل، نانو اکسید آهن (۱۰۰ و ۱۰۰۰) به ترتیب صفر، (۱۰۰۰، ۱۰۰ μg/kg)، نانوذرات اکسید آهن و گروه آهن (۱۰۰۰ μg/kg) یون آهن را یک روز در میان در طی دوران جنینی دریافت کردند. در کلیه موارد آزمونها به تفکیک جنسیت بررسی شد و با توجه به عدم تاثیر آن بر پاسخ آزمونها از ذکر نتایج به تفکیک جنسیت صرف نظر شد. * اختلاف معنی دار با کنترل (* p<۰/۰۵، ** p<۰/۰۱، *** p<۰/۰۰۱)؛ # اختلاف معنی دار با گروه نانو اکسید آهن (۱۰۰۰) (## p<۰/۰۱، ### p<۰/۰۰۱)

بحث و نتیجه گیری

نشان داد که نانوذرات اکسید آهن توانایی عبور از سد خونی-جفتی و نفوذ به جنین در حال تکوین را دارند (۱۳). از طرف دیگر، به علت عدم تشکیل سد خونی-مغزی در دوران جنینی، مواد سمی دسترسی بیشتری به مغز جنین دارند (۱۴). هر چند، آسیب های جفتی ناشی از نانو ذرات به طور بالقوه ممکن است منجر به نقایص تکاملی و یا عقب ماندگی جنین شوند (۱۴)، اما در مطالعه ما هیچ ناهنجاری آشکار و یا عقب ماندگی در رشد زاده هایی که قبل از تولد در معرض نانو ذرات اکسید آهن قرار گرفته بودند مشاهده نشد. شاخص عمومی سلامت نوزادان با اندازه گیری وزن بدن و ثبت مشاهدات در مورد ویژگی های غیر طبیعی جسمانی به دست می آید (۲۹).

تغییرات وزن زاده ها به عنوان یک شاخص از تکامل فیزیکی در دوره نوزادی و از شیرگیری تقریباً یکسان بود که نشان دهنده سلامت زاده ها در گروه های تیمار با نانوذرات اکسید آهن و یون آهن بود. با اینحال در مطالعه Nouri و همکاران کاهش وزن زاده ها در سن ۵۰ روزگی نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری داشت. تناقض این یافته با مطالعه ما احتمالاً ناشی از تفاوت شدید در دوزهای مورد استفاده می باشد. به هر حال در مطالعه ما نیز تأخیر در رویش کرک، باز شدن چشم و نزول بیضه در گروه نانو اکسید آهن ۱۰۰۰ نشان دهنده اختلال در تکامل فیزیکی نوزادان این گروه بود. علی رغم جستجوی فراوان، هیچ گزارشی مبنی بر اثر نانو ذرات اکسید آهن بر شاخص های فیزیکی مورد مطالعه در طی دوران شیرخواری یافت نشد. برخی مطالعات پیشنهاد داده اند که مواجهه با ذراتی در مقیاس نانو نمی تواند اثرات مضر قابل توجهی بر وزن و تکامل فیزیکی ایجاد کند (۳۱). سرعت جذب آهن در مغز پس از تولد و کهنسالی بالاس و افزایش بیش از حد جذب آهن موجب آسیب های رفتاری و فیزیولوژیکی می شود. در واقع استمرار جذب آهن در طی فرآیند افزایش سن باعث تجمع آهن می شود. تجویز مقادیر بالای آهن احتمالاً بر مکانیسم هایی که از مغز در مقابل مسمومیت با آهن محافظت می کند، غلبه کرده و منجر به آسیب های رفتاری می شود (۳۲). اگرچه آهن در چندین فرآیند متابولیک مغزی و در تکامل طبیعی

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه نه تنها تماس موش های باردار با نانوذرات اکسید آهن باعث تأخیر در تکامل بازتاب های عصبی رفتاری زاده ها شد بلکه این اثرات سو به شدت بیشتر از اثرات سوء یون آهن بود. آزمون های باتری فاکس (Battary Fox) یک ارزیابی تکاملی را در خصوص بازتاب های عصبی در طی دوران نوزادی فراهم می کنند چرا که هر یک از این رفتارها در زمان های متفاوتی در طی ۲۱ روز اول زندگی زاده ها بروز می یابند. در مطالعه حاضر، در گروه های تیمار با نانوذرات اکسید آهن، بازتاب های امتناع از پرتگاه، حرکت ماریچ، چسبیدن به سطح، سطح شیب دار، گرفتن میله و دویدن با تأخیر همراه بودند. بازتاب قرار گرفتن روی اندام ها در سطح، برای ارزیابی پاسخ های وضعیتی (بازتاب های مربوط به وضعیت بدن) مورد استفاده قرار می گیرد (۲۹). این بازتاب به هماهنگی بین سر، تنه و اندامها نیاز دارد که در نوزاد انسان در حدود ۶ ماهگی دیده می شود. بازتاب قرار گرفتن روی اندامها در سطح و گرفتن میله نیاز به هماهنگی حسی-حرکتی پیچیده ای بین بخش های مختلف بدن دارد (۳۰). تأخیر در برخی از شاخص های تکاملی گروه مواجه شده با نانو اکسید آهن نشان دهنده اثر مخرب این نانوذرات بر تکامل حسی حرکتی زاده ها است. این اختلال ها ممکن است ناشی از تأخیر در هماهنگی عصبی-عضلانی در مراحل اولیه زندگی باشد. وزن مادران در طی دوران بارداری معیاری از سلامت آنها می باشد (۲۹). بنابراین با توجه به تشابه تغییرات وزنی در گروه های مختلف، استفاده از نانوذرات اکسید آهن باعث اختلال در سلامت عمومی مادران نشد. با اینحال کاهش شاخص بارداری در گروه نانو اکسید آهن ۱۰۰۰ شاید ناشی از کاهش وقوع بارداری یا حفظ آن تا انتهای دوره بارداری باشد. بر اساس مشاهدات ما به نظر می رسد کاهش زنده مانی در نوزادان این گروه نیز ناشی از افزایش میل بچه خواری در مادران بوده است. بنابراین شاید نانوذرات اکسید آهن باعث تغییر رفتار مادری شده باشد. در مطالعه Nouri و همکاران نیز تجویز داخل صفاقی غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانوذرات اکسید آهن به موش های سوری باردار، میانگین وزن مادران باردار و تعداد زاده ها را تحت تأثیر قرار نداد. مشاهدات Nouri و همکاران

یون آهن نسبت داد و احتمالاً مکانیسم‌هایی به جز آزاد شدن یون آهن و عوارض آن نیز باید مطرح باشند. البته باید این موضوع را نیز در نظر گرفت که احتمالاً مکانیسم‌های انتقال دهنده یون آهن و نانو ذرات اکسید آهن به جنین و نهایتاً مغز و سلول‌های عصبی با یکدیگر متفاوت بوده و شاید انتقال این نانو ذرات به سلول‌های سیستم عصبی به صورت موثرتری صورت گیرد. این اولین گزارشی است که نشان می‌دهد تزریق زیرجلدی نانوذرات اکسید آهن (۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم) و یون آهن (۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم)، به موش‌های ماده طی جفت‌گیری و بارداری باعث کاهش باروری می‌شود. هر چند رشد زاده‌های تیمار شده در این مطالعه از نظر ظاهری و وزنی طبیعی بود این مطالعه نشان داد مواجهه پیش از تولد با نانوذرات اکسید آهن باعث تأخیر در تکامل بازتاب‌های عصبی-عضلانی و برخی شاخص‌های تکامل فیزیکی شده است، لذا باید از تماس مادران با نانوذرات اکسید آهن جلوگیری شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز جهت حمایت مالی از این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

سیستم عصبی در طی دوره نوزادی حیاتی است، ولی بر اساس شواهد بسیار افزایش آهن در نواحی خاصی از مغز مثل عقده‌های قاعده‌ای یا جسم سیاه ممکن است رادیکال‌های آزاد سیتوتوکسیک تولید کند و یا موجب تغییر در متابولیسم آهن شود (۳۳). افزایش تجمع یون‌های آهن منجر به استرس اکسیداتیو و تخریب نورونی در مغز خواهد شد (۳۴ و ۳۵)، زیرا آهن مولکولی فعال بوده و قادر است پدیده اکسیداتیو سلولی را آغاز یا تشدید نماید (۳۶). گونه‌های اکسیژن واکنشی یک منبع سمیت تکاملی هستند (۳۷) و افزایش سطح آنها موجب اختلال در هموستاز داخل سلولی، آغاز آپوپتوز (۳۸) و در نهایت منجر به سمیت مادر و جنین (۱۴)، استرس و تولید عوامل تراتوژن در جنین می‌شود (۳۹ و ۴۰). نانوذرات اکسید آهن می‌توانند منجر به تغییر بیان ژن، مدولاسیون اکتین، تداخل با تنظیم چرخه سلولی و مسیرهای انتقال سیگنال، تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و اختلال در هموستاز آهن شوند (۴۱ و ۴۲). مواجهه ی مادران با نانو ذرات می‌تواند باعث تغییر بیان ژن در قسمتی از سیستم اعصاب مرکزی زاده‌ها که مربوط به رشد و عملکرد مغز است، شود (۴۲). هرچند تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی توسط نانوذرات اکسید آهن نیز گزارش شده است (۴۳ و ۴۴)، ولی از آن جایی که اثرات مخرب یون آهن در مطالعه حاضر بسیار کمتر از نانوذرات آهن بود به نظر می‌رسد تمامی عوارض در گروه‌های نانوذرات آهن را نمی‌توان به آزاد شدن

Archive of SID

Effects of Iron Oxide Nanoparticles and Iron Ions on Reproductive Indices of Pregnant Syrian Rats and Neuro-Behavioral Development of Newborns

F. Anbarian (MSc)¹, S.R. Fatemi Tabatabaei (PhD)^{*1}, I. Kazeminezhad (PhD)², S. Mohammadian (MSc)¹

1.Department of Physiology, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R.Iran

2.Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(3); Mar 2016; PP:45-53

Received: Apr 9th 2015, Revised: Jul 29th 2015, Accepted: Sep 28th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Considering the high sensitivity of embryo and fetus to toxic agents and increasing use of nanomaterials such as iron oxide nanoparticles in medicine, this study aimed to determine the effects of iron oxide nanoparticles and iron ions on reproductive indices of pregnant Syrian rats and neuro-behavioral development of their newborns.

METHODS: This experimental study was conducted on 49 pregnant Syrian rats, which were divided into one control and three study groups. The study groups were subcutaneously injected 100 and 1000 µg/kg of iron oxide nanoparticles and 1000 µg/kg of ferric iron ions (equivalent to the amount of iron ions in 1000 µg/kg of iron oxide nanoparticles), respectively. Injections were performed four days before mating until delivery on alternate days. Reproductive indices of pregnant rats, as well as neuro-behavioral and physical development of newborns, were evaluated with respect to sex; newborns' development was recorded in days.

FINDINGS: Multiple neuro-behavioral reflexes and developmental indices were delayed in the study groups, especially in the group receiving 1000 µg/kg of iron oxide nanoparticles, compared to the control group. Based on the findings, cliff-drop aversion reflex (1.35±0.13 and 2.70±0.13, respectively; p<0.001), level or vertical stick reflex (2.55±0.20 and 3.45±0.20, respectively; p<0.01), negative geotaxis (2.60±0.22 and 3.50±0.22, respectively; p<0.01), bar holding reflex (5.85±0.44 and 7.30±0.44, respectively; p<0.05), running (7.75±0.23, 8.70±0.23; p<0.01), fur development (5.90±0.18 and 6.85±0.18, respectively; p<0.001), eye opening (14.25±0.22 and 15.25±0.22, respectively; p<0.01), and testes descent (21.20±0.18 and 22.40±0.18, respectively; p<0.001) were delayed in rats receiving 1000 µg/kg of iron oxide nanoparticles, compared to the control group. However, in most cases, shorter delays were observed in groups receiving 100 µg/kg of iron oxide nanoparticles and 1000 µg/kg of iron ions, respectively.

CONCLUSION: The present study revealed that exposure to iron oxide nanoparticles in the embryonic period could lead to severe complications; also, iron oxide nanoparticles were shown to be more toxic than iron ions.

KEY WORDS: *Iron oxide nanoparticles, Prenatal period, Infancy, Neuro-behavioral development.*

Please cite this article as follows:

Anbarian F, Fatemi Tabatabaei SR, Kazeminezhad I, Mohammadian S. Effects of Iron Oxide Nanoparticles and Iron Ions on Reproductive Indices of Pregnant Syrian Rats and Neuro-Behavioral Development of Newborns. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(3):45-53.

*Corresponding Author: S.R. Fatemi Tabatabaei

Address: Department of Physiology, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R.Iran

Tel: +98 61 33330010-19

E-mail: fatemi_r@scu.ac.ir

References

1. Buzea C, Pacheco I, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007; 2(4): 17-71.
2. Emerich DF. Nanomedicine--prospective therapeutic and diagnostic applications. *Expert Opin Biol Ther*. 2005; 5(1):1-5.
3. Koopmans RJ, Aggeli A. Nanobiotechnology-quo vadis?. *Curr Opin Microbiol*. 2010;13(3):327-34.
4. Najafzadeh H, Rezaei M, Ashrafi A, Samimi A. Apoptosis following conventional and nano-particles of sodium arsenite treatment in hepatocytes of rat. *J Babol Univ Med Sci*. 2014;16(8):40. [In Persian]
5. Mirkovic B, Turnsek TL, Kos J. Nanotechnology in the treatment of cancer. *Zdrav Vestn Med J*. 2010;79(2):146-55.
6. Lee Y, Choi J, Kim P, Choi K, Kim S, Shon W, et al. A transfer of silver nanoparticles from pregnant rat to offspring. *Toxicol Res*. 2012;28(3):139-41
7. Tian F, Razansky D, Estrada GG, Semmler-Behnke M, Beyerle A, Kreyling W, et al. Surface modification and size dependence in particle translocation during early embryonic development. *Inhal Toxicol*. 2009;21(1):92-6.
8. Wick P, Malek A, Manser P, Meili D, Maeder-Althaus X, Diener L, et al. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ Health Perspect*. 2010;118(3): 432-6.
9. Elder A, Gelein B, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, J Carter, et al. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide nanoparticles to the central nervous system. *Environ Health Perspect*. 2006;114(8):1172-8.
10. Oravec K, Kalka D, Jeney F, Cantz M, Nagy IZ. Hydroxyl free radicals induce cell differentiation in SK-N-MC neuroblastoma cells. *Tissue Cell*. 2002;34(1):33-8.
11. Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, et al. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(5):321-8.
12. Gomez M, Hernandez M, Johansson B, de Miguel R, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J. Prenatal Cannabinoid and gene expression for neural adhesion molecule L1 in the fetal rat brain. *Dev Brain Res*. 2003;147(1-2):201-7.
13. Noori A, Parivar K, Modaresi M, Messripour M, Yousefi MH, Amiri GR. Effect of magnetic iron oxide nanoparticles on pregnancy and testicular development of mice. *Afr J Biotechnol*. 2011;10(7):1221-1227.
14. Sun JL, Zhang Q, Wang ZP, Yan B. Effects of nanotoxicity on female reproductivity and fetal development in animal models. *Int J Mol Sci*. 2013;14(5):9319-9337.
15. Singh N, Jenkins GJ, Asadi R, Doak SH. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev*. 2010;1(10):5358.
16. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro*. 2005;19(7):975-83.
17. Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett*. 2009;188(2):112-118.
18. Mohseni Kouchesfehiani H, Kiani S, Rostami AA, Fakheri R. Cytotoxic Effects of Iron Oxide Nanoparticles on Mouse Embryonic Stem Cells by MTT Assay. *Iran J Toxicol*. 2013; 21(7):849-53.
19. Szalay B, Tátrai E, Nyíró G, Vezér T, Dura G. Potential toxic effects of iron oxide nanoparticles in in vivo and in vitro experiments. *J Appl toxicol*. 2012;32(6):446-53.
20. Moslemi N, Najafzadeh H, Koochak M, Shahriary A. Evaluation of lipid profile and oxidative stress indices in serum and liver of rat after iron-oxide nanoparticle administration. *Feyz*. 2013;17(3):247-54. [In Persian]
21. Khorshidi M, Kesmati M, KhajehPour L, NajafZadeh Varzi H. 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*. 2013;17(2):204-215. [In Persian]
22. Di Bona KR, Xu Y, Ramirez PA, DeLaine J, Parker C, Bao Y, et al. Surface charge and dosage dependent potential developmental toxicity and biodistribution of iron oxide nanoparticles in pregnant CD-1 mice. *Reprod Toxicol*. 2014;50:36-42.

23. Mello PR, Okay TS, Botelho C. The effects of exposing rats to cigarette smoke on milk production and growth of offspring. *J de Pediatria*. 2007;83(3):267-73.
24. Ivani S, Karimi I, Tabatabaei SR. Biosafety of multiwalled carbon nanotube in mice: a behavioral toxicological approach. *J Toxicol Sci*. 2012;37(6):1191-205.
25. Ratnasooriya WD, Jayakody JR, Premakumara GA. Adverse pregnancy outcome in rats following exposure to a *Salacia reticulata* (Celastraceae) root extract. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36(7):931-5.
26. Fox CL, Rao TNV, Azmeth R, Gandhi SS, Modak Sh. Comparative evaluation of zinc sulfadiazine and silver sulfadiazine in burn wound infection. *J Burn Care Rehabil*. 1990;11(2):112-7.
27. Tamashiro KL, Wakayama T, Blanchard RJ, Blanchard DC, Yanagimachi R. Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells. *Biol Reprod*. 2000;63(1):328-34.
28. Tsujii H, Hoshishima K. The effect of the administration of trace amounts of metals to pregnant mice upon the behavior and learning of their offspring. *J Fac Agric Shinshu Univ*. 1979;16(1):13-27.
29. Crawley JN, Paylor R. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm Behav*. 1997;31(3):197-211.
30. Laviola G, Adriani W, Gaudino C, Marino R, Keller F. Paradoxical effects of prenatal acetylcholinesterase blockade on neuro-behavioral development and drug-induced stereotypies in reeler mutant mice. *Psychopharmacol*. 2006;187(3):331-44.
31. Hougaard KS, Jensen KA, Nordly P, et al. Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice. *Part Fibre Toxicol*. 2008;5(3):3.
32. Maaroufi K, Ammari M, Jeljeli M, Roy V, Sakly M, Abdelmelek H. Impairment of emotional behavior and spatial learning in adult wistar rats by ferrous sulfate. *Physiol Behav*. 2009;96(2):343-9.
33. de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Grazziotin MM, Garcia VA, Dal-Pizzol F, et al. Selegiline protects against recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment. *Exp Neurol*. 2005;196(1):177-83.
34. Thompson KJ, Shoham S, Connor JR. Iron and neurodegenerative disorders. *Brain Res Bull*. 2001;55(2):155-64.
35. Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(11):863-73.
36. Bhattacharya A, Ramanathan M, Ghosal S, Bhattacharya SK. Effect of withania samra glycoethanolides on iron induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res*. 2000;14(7):568-70.
37. Wells PG, Bhuller Y, Chen CS, Jeng W, Kasapinovic S, Kennedy JC, et al. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;207(2):354-66.
38. Li Y, Liu Y, Fu Y, Wei T, Le Guyader L, Gao G, et al. The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. *Biomater*. 2012;33(2):402-11.
39. Rahman MF, Wang J, Patterson TA, Saini UT, Robinson BL, Newport GD, et al. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. *Toxicol Lett*. 2009;187(1):15-21.
40. Wang B, Feng W, Zhu M, Wang Y, Wang M, Gu Y, et al. Neurotoxicity of low-dose repeatedly intranasal instillation of nano- and submicron-sized ferric oxide particles in mice. *J Nanopart Res*. 2009;11(1):41-53.
41. Karmakar A, Zhang Q, Zhang Y. Neurotoxicity of nanoscale materials. *J Food Drug Anal*. 2014;22(1):147-160.
42. Shimizu M, Tainaka H, Oba T, Mizuo K, Umezawa M, Takeda K. Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Part Fibre Toxicol*. 2009;6:20.
43. Bhattacharya K, Hoffmann E, Schins RF, Boertz J, Prantl EM, Alink GM, Byrne HJ, et al. Comparison of micro- and nanoscale Fe³⁺-containing (Hematite) particles for their toxicological properties in human lung cells *In Vitro*. *Toxicol Sci*. 2012;126(1):173-82.
44. Guichard Y, Schmit J, Darne C, Gaté L, Goutet M, Rousset D, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of nanosized and microsized titanium dioxide and iron oxide particles in Syrian hamster embryo cells. *Ann Occup Hyg*. 2012;56(5):631-44.