

مطالعه‌ی اثرات سایتوتوکسیک نانو دی اکسید تیتانیوم بر رشد و نمو جوانه‌ی اندام حرکتی جلویی جنین موش نژاد NMRI در شرایط *in vivo*

دکتر نسیم حیاتی رودباری^۱، دکتر کاظم پریور^۱، دکتر علیرضا بدیعی^۲، سمانه ذوالفقاری باروق^۱

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی nasimhayati@yahoo.com

دریافت: ۹۱/۱۱/۷ پذیرش: ۹۲/۷/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به اینکه نانو دی اکسید تیتانیوم در موادی مانند کرم‌های ضد آفتاب و شوینده‌ها ممکن است مورد استفاده مادران باردار قرار گیرد و نیز تا به حال تحقیقی در مورد استفاده این ماده و اثرات آن بر روی اندام حرکتی جنین انجام نشده است، لذا هدف از این کار تحقیقاتی بررسی اثر TiO_2 بر روی جوانه‌ی اندام حرکتی جلویی می‌باشد.

روش بررسی: در این روش، پنج گروه از جوانه‌های اندام حرکتی جلویی شامل گروه‌های کنترل، شش و گروه‌های تجربی ۱ (دز ۳۰) تجربی ۲ (دز ۱۵۰) و تجربی ۳ (دز ۵۰۰) مورد بررسی قرار گرفتند. در روز ۱۱ بارداری، گروه کنترل بدون تاثیر TiO_2 ، گروه شش با تزریق آب مقطر دیونایز به‌عنوان حلال TiO_2 و گروه‌های تجربی با تزریق دوزهای ۵۰۰، ۱۵۰، ۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن موش از TiO_2 با قطر ۱۰ nm مورد بررسی قرار گرفتند. سپس در روز ۱۵ بارداری، جنین‌ها از بدن مادر خارج و جوانه‌های اندام حرکتی جلویی آن‌ها جدا گردید.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان دهنده‌ی تغییرات معنی‌داری در اندام حرکتی جلویی بودند که دزهای ۳۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش معنی‌داری در طول کل اندام، ضخامت پوست، تعداد سلول‌های مزانشیم انگشت و کندروسیت دژنره شده ساعد و کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های کندروسیت در حال تکثیر بازو، سلول‌های مزانشیم کف و میج دست، سلول‌های مزانشیمی در حال تقسیم میتوز و گلبول قرمز خون انگشت داشتند و دوز ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کاهش معنی‌داری در طول کل اندام، ضخامت پوست ساعد، تعداد سلول‌های کندروسیت در حال تکثیر بازو، گلبول قرمز خون انگشت و سلول‌های مزانشیم کف و میج دست داشت.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان دهنده‌ی اثرات سایتوتوکسیک کاهنده و افزایش‌دهی نانو ذرات TiO_2 بر رشد جوانه‌های اندام حرکتی جلویی در جنین موش سوری در شرایط *in vivo* است.

واژگان کلیدی: نانو دی اکسید تیتانیوم، اثر سایتوتوکسیک، جوانه اندام حرکتی جلویی، غضروف زایی، موش سوری

مقدمه

هستند. امروزه نانو ذرات در زندگی بشر کاربردهای فراوانی دارد. این مواد در شماری از محصولات تجاری در دسترس، یافت می‌شوند که شامل مواد پرکننده، کاتالیزورها، مواد آرایشی و تعداد زیادی کاربردهای صنعتی می‌باشند (۲).

نانوتکنولوژی، علم ایجاد ذرات بسیار بسیار ریز در مقیاس مولکولی به منظور ایجاد موادی با رفتارها و خواص شیمیایی جدید و متفاوت می‌باشد (۱). به طور کلی، نانو مواد ساختارهای طراحی شده در ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر

۱- دکترای تخصصی سلولی تکوینی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

۲- دکترای تخصصی شیمی معدنی، دانشگاه تهران، پردیس علوم پایه، دانشکده شیمی، تهران، ایران

این کار برای اولین بار انجام شده است، این تحقیق می‌تواند در این زمینه سودمند باشد.

روش بررسی

در این روش از موش سفید کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI به‌عنوان حیوان مورد آزمایش استفاده شد که از انستیتو پاستور تهران خریداری و نگهداری حیوانات مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت انجام گردید. در این مرحله برای هر دوز در هر گروه تعداد شش سر موش سوری به کار گرفته شدند و موش‌های باردار به سه گروه تقسیم شدند: ۱- گروه کنترل (بدون تأثیر TiO_2) ۲- گروه شم (با تزریق آب مقطر دیونایز به‌عنوان حلال TiO_2 در روز ۱۱ حاملگی) ۳- گروه تجربی (با تزریق غلظت‌های ۳۰، ۱۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن موش از TiO_2 با قطر ۱۰ nm در روز ۱۱ حاملگی) دوزهای مورد استفاده در این تحقیق ۳۰، ۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن موش بودند که با توجه به تأثیرات کمتر دوزهای ۵۰ و ۳۰۰ این دوزها حذف و دوزهای ۳۰، ۱۵۰ و ۵۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند. سپس در روز ۱۵ حاملگی، موش‌های باردار توسط اتر یا کلروفرم بیهوش شدند و بعد بر روی تشک تشریح به پشت خوابانده شده و پوست شکم آنها برش داده شد. سپس لوله‌های رحمی با دقت از بدن مادر جدا گردید و در داخل یک ظرف پتری حاوی سرم فیزیولوژی و بعد در HBSS (Hanks balanced salt solution) قرار گرفته و شستشو داده شدند. در مرحله بعد جنین‌ها در زیر میکروسکوپ استریو (مدل Olympus cx31) از بافت رحمی و سپس پرده آمینیونی خارج شدند و جوانه اندام حرکتی جلویی آنها جدا گردید و در داخل ظرف پتری که حاوی HBSS تازه بود قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت دو ساعت در فیکساتور بوئن فیکس شدند و بعد مراحل آبگیری (اتانول)، شفاف سازی (تولوئن)، آغشته ساختن با

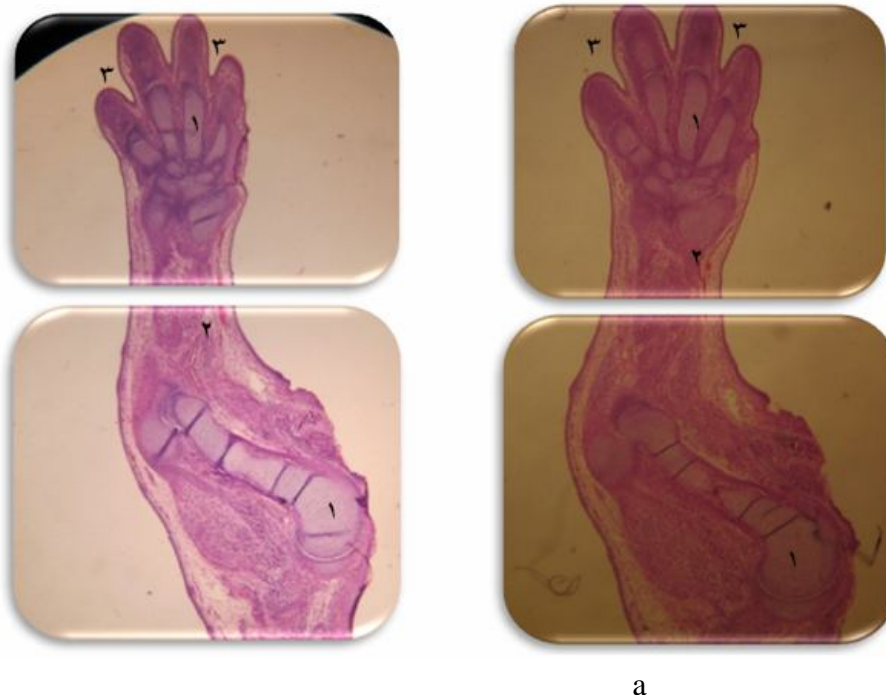
بیشتر نانو ذرات با گسترش نانوتکنولوژی به طبیعت آزاد می‌شوند. اخیراً تأثیرات نانو ذرات بر روی انسان و محیط برای تعدادی از دانشمندان و سازمان‌ها نگران کننده می‌باشد (۳ و ۴). کریستال TiO_2 به سه شکل آناتاز (anatase)، روتیل (rutile) یا بروکایت (brookite) وجود دارد (۵ و ۶). نانو ذرات TiO_2 به دلیل توان بازتابشی بالا برای حفاظت در مقابل اشعه فرابنفش مورد استفاده قرار می‌گیرند. ضد آفتاب‌های بسیاری شامل این نانو ذرات که به خوبی سطح را می‌پوشانند تولید شدند که بی‌رنگ هستند و اشعه UV را با راندمان بیشتر از ذرات بزرگتر پراکنده و منعکس می‌کنند (۲). از ویژگی‌های مهم این نانو مواد جامد معدنی، فعالیت فوتوکاتالیتیکی از سطح پوشش‌های آنتی‌باکتریال تا سطح واکنش‌های فوتوکاتالیتیکی می‌باشد (۷). این نانو مواد همچنین در تخریب مواد بیولوژیکی مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها و حال‌ها کارایی دارد (۸). نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم از طریق مسیرهای مختلف از قبیل استنشاق کردن، خوردن، نفوذ پوستی و تزریق وارد بدن انسان می‌شوند (۹ و ۱۰). این نانو ذرات می‌توانند سبب بروز ضایعه در کبد و کلیه (۴)، افزایش چین و چروک در پوست (۱۱)، القای تنش اکسیداتیو (۱۲)، کاهش چشمگیر تولید روزانه اسپرم در زاده‌های نر (۱۳)، نکروز هپاتوسیت کبد و آسیب عملکرد ریه در موش‌ها (۴)، آسیب سیستم همئوستازیس خون و کاهش ایمنی (۱۴)، افزایش ریز هسته‌ها (MN) در سلول‌های لنفوبلاستوئید (۴)، فیبروبلاست‌های جنینی همستر (۱۵) و سلول‌های CHO-K1 در تخمدان همستر چینی (۱۶)، القای تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در حیوانات (۱۷) و افزایش لیپید پراکسیداز در مغز و کبد موش و حمله‌ی اکسیداتیو با کاهش مکانیسم دفاعی اکسیداتیو (۱۸ و ۱۹) شوند. با توجه به این که این نانو ذره می‌تواند از میان جفت عبور کند و به این دلیل که تا به حال تحقیقی بر روی اثر TiO_2 بر روی رشد و نمو جوانه‌ی اندام حرکتی در جهان و ایران صورت نگرفته و

متغیرها مشخص می‌شود. سپس در دو مقطع از ۴ لام طول نواحی مختلف جوانه‌ها با استفاده از گراتیکول خطی اندازه‌گیری (۲۰) و تعداد سلول‌ها شمارش گردید. نتایج بدست آمده به صورت اعداد خام به کامپیوتر داده شد و آنگاه تحلیل و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار در $P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$ با در نظر گرفتن خطای استاندارد (SE) و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و تست توکی (Tukey) انجام گردید و سپس با استفاده از نرم‌افزار، هیستوگرام‌ها ترسیم شدند.

یافته‌ها

جوانه‌های اندام حرکتی جلویی در روز ۱۵ رشد و نمو جنینی از بدن جنین جدا شدند.

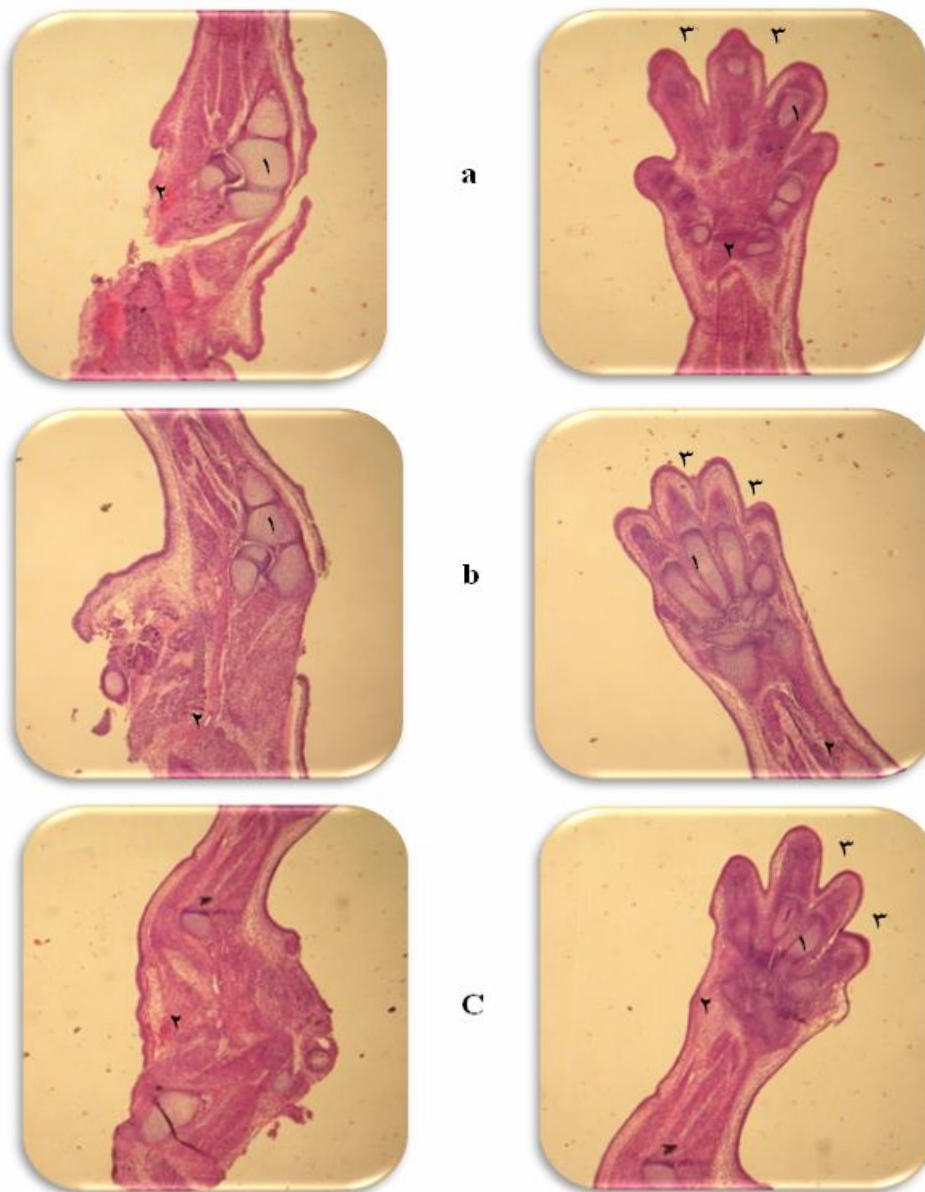
حمام پارافین، قالب‌گیری با پارافین انجام گرفت. سپس از قالب‌های تهیه شده با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری برش‌هایی به ضخامت ۰/۶ میکرومتر تهیه شد و بعد با رنگ هماتوکسیلین-ائوزین رنگامیزی صورت گرفت (۲۰) و در پایان مقاطع بعد از لامل گذاری آماده مطالعه شدند. بعد لام‌های تهیه شده تحت مطالعات میکروسکوپی و ماکروسکوپی قرار گرفتند و تغییرهایی از قبیل طول اندام، ضخامت پوست، تعداد سلول‌های مزانشیمی، کندروسیتی، کندروسیت در حال استراحت، کندروسیت در حال تکثیر، کندروسیت‌ها پیرتروفی، کندروسیت دژنره شده، گلبول قرمز خون، سلول مزانشیمی در حال تقسیم میتوز و سلول مزانشیمی آتروفیه شده بررسی شدند. با توجه به اینکه اثر این نانو ذره بر روی این متغیرها منجر به ناهنجاری در رشد و نمو اندام حرکتی می‌گردد، لذا اهمیت بررسی هر یک از این



شکل ۱: فتومیکروگراف مقطع فرونتال جوانه اندام حرکتی جلویی نمونه کنترل (a) و نمونه شم (b) در روز ۱۵ جنینی بخش پراکسیمال (شکل بالا) و بخش دیستال (شکل پایین). تجمعات غضروفی (۱)، مقاطع رگ‌های خونی (۲) و شیارهای انگشتی (۳) مشخص می‌باشند. (بزرگنمایی ۴۰x)

تجربی ۳ (دوز ۵۰۰ میلی گرم / کیلوگرم وزن موش) تحت بررسی های میکروسکوپی و ماکروسکوپی قرار گرفتند و به لحاظ ظاهری، تغییرات مورفولوژیکی که با چشم قابل دیدن باشد وجود نداشت و تمام جوانه ها سالم بودند.

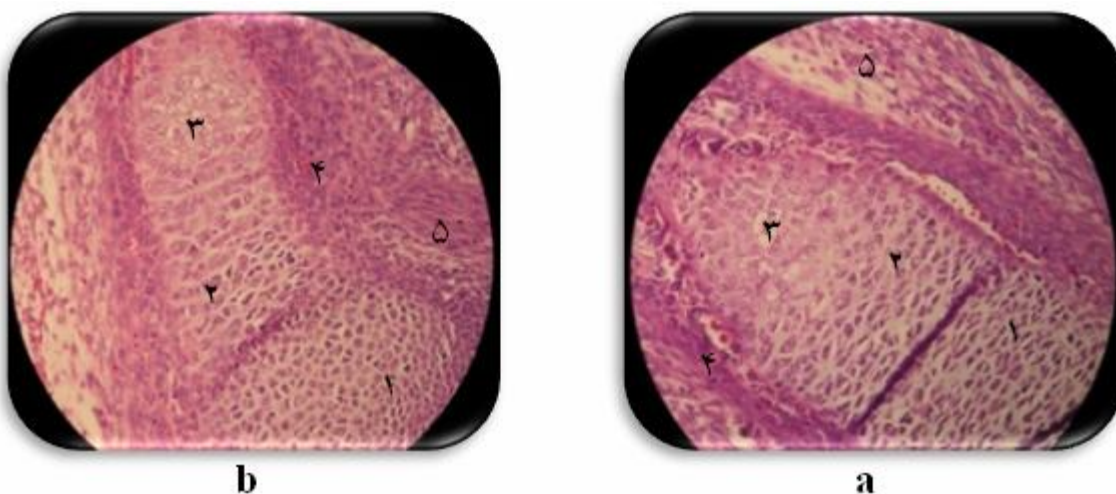
تصاویر فتومیکروگراف آن ها در اشکال ۱ و ۲ نشان داده شده است و عکس ها دقیقاً مربوط به همین مطالعه است. جوانه های اندام حرکتی جلویی در پنج گروه کنترل، شم و گروه های تجربی ۱ (دوز ۳۰)، تجربی ۲ (دوز ۱۵۰) و



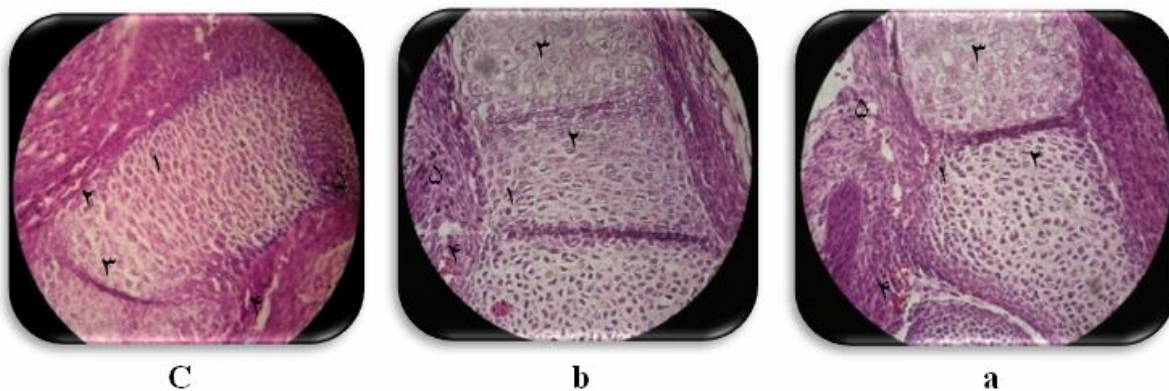
شکل ۲. فتومیکروگراف مقطع فرونتال جوانه اندام حرکتی جلویی نمونه تجربی دوز ۳۰ (a)، نمونه تجربی دوز ۱۵۰ (b) و نمونه تجربی دوز ۵۰۰ (c) در روز ۱۵ جنینی. بخش پراکسیمال (شکل راست) و بخش دیستال (شکل چپ). تجمعات غضروفی (۱)، مقاطع رگ های نخونی (۲) و شیارهای انگشتی (۳) مشخص می باشند. (بزرگنمایی ۳۳۲x)

حال تکثیر، کندروسیت هایپرتروفی، کندروسیت دژنره شده، گلبول قرمز خون، سلول مزانشیمی در حال تقسیم میتوز و سلول مزانشیمی آتروفیه شده مشخص گردید (اشکال ۳ و ۴). با مقایسه‌ی هیستوگرام‌ها (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵) و جداول (۶-۱) هر یک از این نمونه‌ها با یکدیگر، اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$).

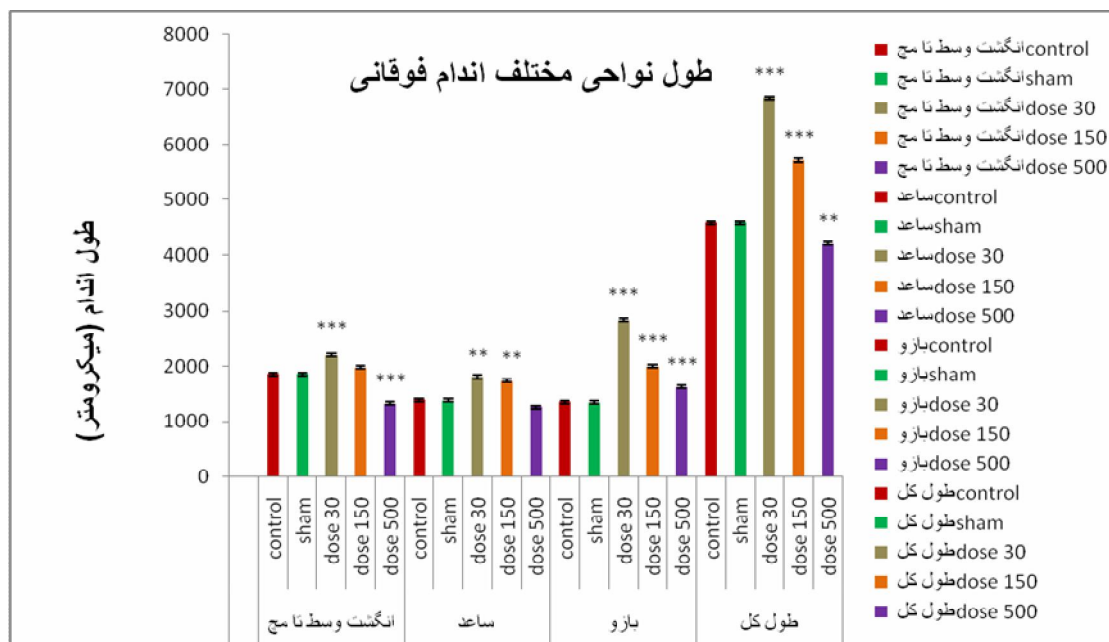
با بررسی میکروسکوپی فتومیکروگراف‌های جوانه‌های اندام حرکتی جلویی سه گروه کنترل، شم و تجربی فاکتورهای از قبیل طول منطقه ۱ (انگشت وسط تا مچ دست)، طول منطقه ۲ (مچ دست تا آرنج)، طول منطقه ۳ (آرنج تا انت‌های بازو)، طول کل اندام، ضخامت پوست، تعداد سلول‌های مزانشیمی، کندروسیتی، کندروسیت در حال استراحت، کندروسیت در



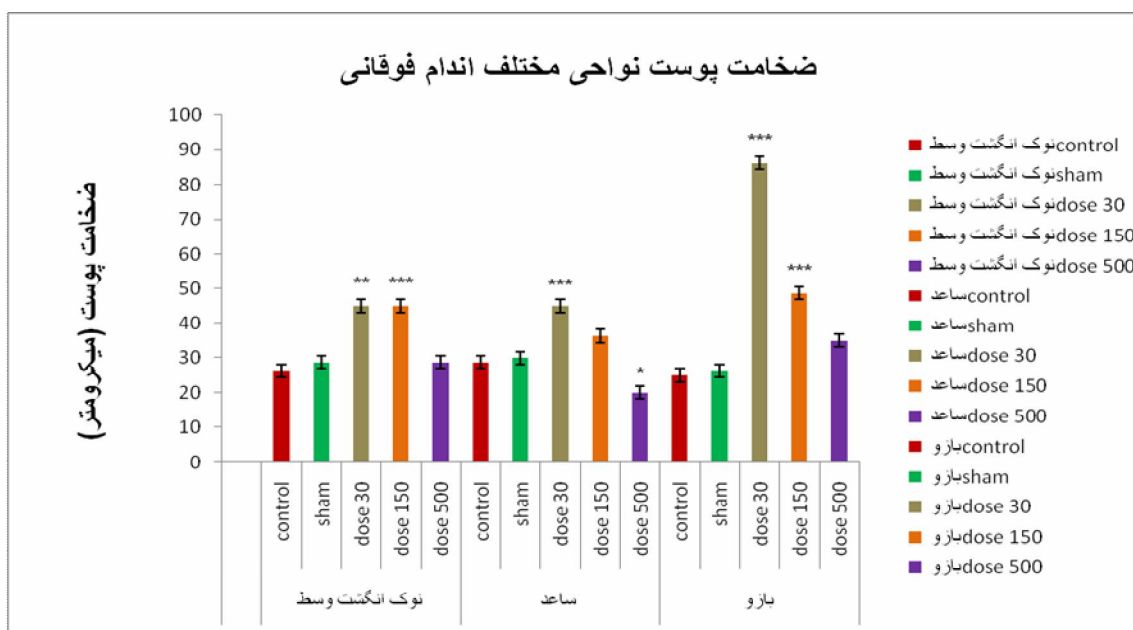
شکل ۳. فتومیکروگراف جوانه اندام حرکتی جلویی نمونه کنترل (a) و نمونه شم (b) در روز ۱۵ جنینی. سلول کندروسیت در حال تکثیر (۱)، کندروسیت هایپرتروفی شده (۲)، کندروسیت دژنره شده (۳)، گلبول قرمز (۴) و سلول آتروفیه شده (۵) مشخص می‌باشند (بزرگنمایی $\times 400$)



شکل ۴. فتومیکروگراف جوانه اندام حرکتی جلویی نمونه تجربی ۱ (a)، نمونه تجربی ۲ (b) و نمونه تجربی ۳ (c) در روز ۱۵ جنینی سلول کندروسیت در حال تکثیر (۱)، کندروسیت هایپرتروفی شده (۲)، کندروسیت دژنره شده (۳)، گلبول قرمز (۴) و سلول آتروفیه شده (۵) مشخص می‌باشند. (بزرگنمایی $\times 400$)

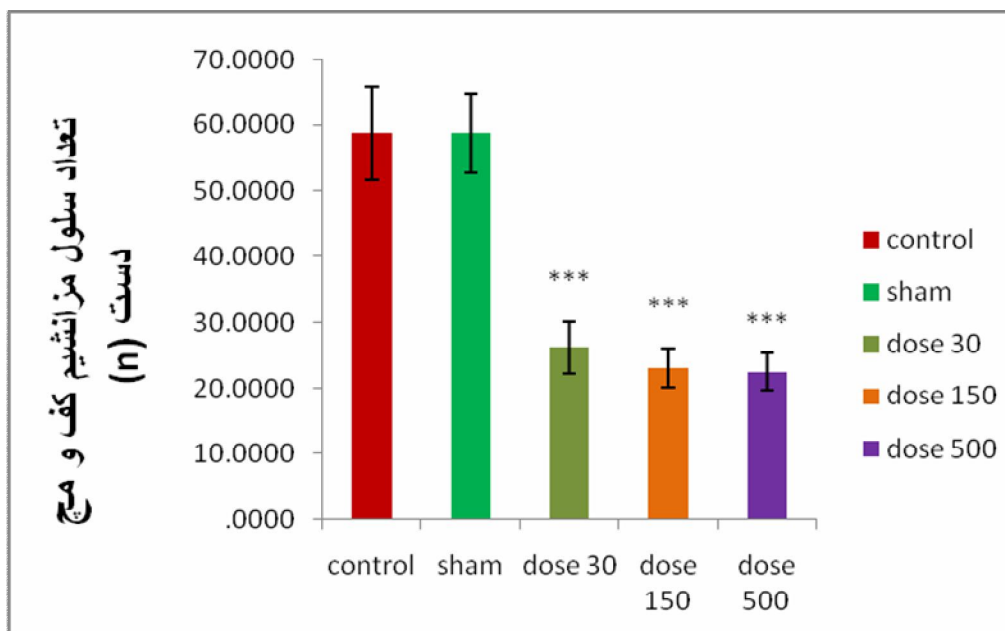


هیستوگرام ۱: مقایسه‌ی طول منطقه ۱ (انگشت وسط تا مچ دست)، منطقه ۲ (مچ دست تا آرنج)، منطقه ۳ (آرنج تا انتهای بازو) و طول کل جوانه اندام حرکتی جلویی در گروه‌های کنترل، شام و تجربی



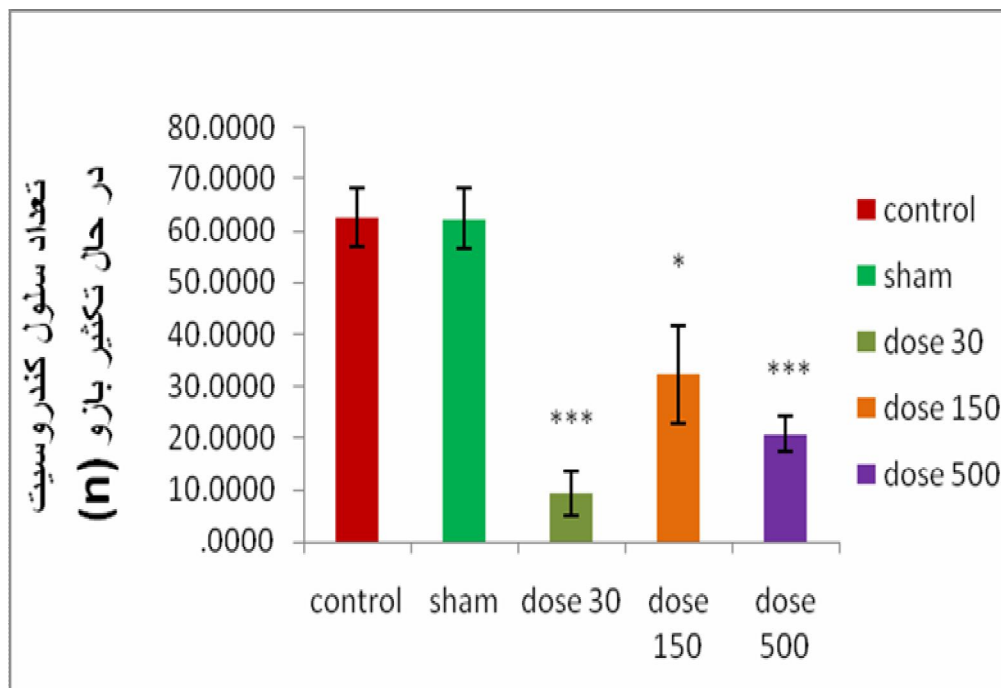
(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

هیستوگرام ۲: مقایسه‌ی ضخامت پوست منطقه ۱ (نوک انگشت وسط)، منطقه ۲ (ساعد) و منطقه ۳ (بازو) جوانه اندام حرکتی جلویی در گروه‌های کنترل، شام، تجربی ۱، تجربی ۲ و تجربی ۳.



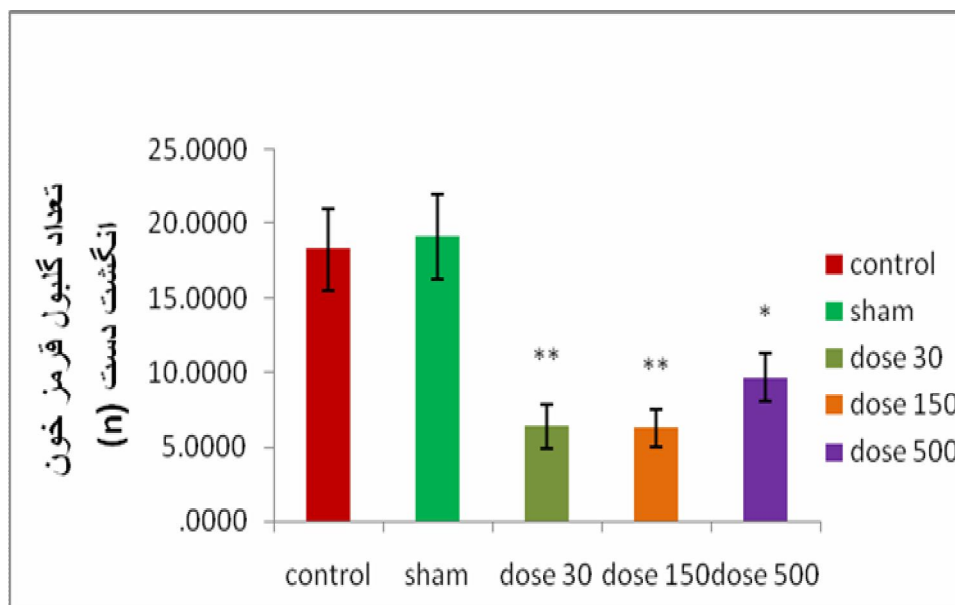
(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

هیستوگرام ۳. تعداد سلول‌های مزانشیمی در اندام حرکتی جلویی در منطقه کف و مچ دست در گروه‌های کنترل، شم، تجربی ۱، تجربی ۲ و تجربی ۳



(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

هیستوگرام ۴. تعداد سلول‌های کاندروسیتی در حال تکثیر در اندام حرکتی جلویی در منطقه بازو در گروه‌های کنترل، شم، تجربی ۱، تجربی ۲ و تجربی ۳



(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

هیستوگرام 5. تعداد گلبول‌های قرمز خون در اندام حرکتی جلویی در منطقه انگشت دست در گروه‌های کنترل، شام، تجربی 1، تجربی 2 و تجربی 3

جدول 1: نتایج تحلیل آماری طول منطقه 1 (انگشت وسط تا میچ دست)، منطقه 2 (میچ دست تا آرنج) و منطقه 3 (آرنج تا انتهای بازو) در گروه‌های کنترل، شام، تجربی 1، تجربی 2 و تجربی 3 $\bar{X} \pm SE$.

مشاهده/تیمار	کنترل	شام	تجربی 1	تجربی 2	تجربی 3
منطقه 1 (μm)	1854/62 ± 36/45	1856/25 ± 35/59	2203/12 ± 24/74	1978/12 ± 81/34	1328/12 ± 19/72
منطقه 2 (μm)	1385/62 ± 95/13	1384/37 ± 95/54	1806/25 ± 42/19	1734/37 ± 43/79	1256/25 ± 21/52
منطقه 3 (μm)	1348/12 ± 17/42	1346/87 ± 16/66	2840/62 ± 29/48	2000 ± 73/49	1621/87 ± 14/51

جدول 2: نتایج تحلیل آماری ضخامت پوست منطقه 1 (نوک انگشت وسط)، منطقه 2 (ساعد) و منطقه 3 (بازو) در گروه‌های کنترل، شام، تجربی 1، تجربی 2 و تجربی 3 $\bar{X} \pm SE$.

مشاهده/تیمار	کنترل	شام	تجربی 1	تجربی 2	تجربی 3
منطقه 1 (μm)	26/25 ± 3/23	28/75 ± 3/50	45 ± 3/77	45 ± 2/67	28/75 ± 2/95
منطقه 2 (μm)	28/75 ± 2/26	30 ± 0	45 ± 3/27	36/25 ± 2/63	20 ± 0
منطقه 3 (μm)	25 ± 3/27	26/25 ± 2/63	86/25 ± 4/19	48/75 ± 2/26	35 ± 1/88

جدول ۳. نتایج تحلیل آماری تعداد سلول‌های مزانشیمی در مناطق انگشت، کف و مچ دست در گروه‌های کنترل، شم، تجربی ۱، تجربی ۲ و تجربی ۳ ($\bar{X} \pm SE$).

مشاهده/تیمار	کنترل	شم	تجربی ۱	تجربی ۲	تجربی ۳
انگشت	۵/۷۵±۰/۴۵	۶± ۰/۴۲	۴۴/۸۷±۵/۷۹	۱۹/۱۲±۳/۰۴	۸/۷۵± ۱/۶
کف و مچ	۵۸/۸۷±۷/۰۷	۵۸/۷۵±۵/۹۵	۲۶/۲۵±۳/۹۸	۲۳/۱۲±۲/۹۷	۲۲/۵±۲/۹۲

جدول ۴. نتایج تحلیل آماری تعداد سلول‌های کندروسیتی در حال تکثیر در مناطق کف و مچ دست، ساعد و بازو در گروه‌های کنترل، شم، تجربی ۱، تجربی ۲ و تجربی ۳ ($\bar{X} \pm SE$).

مشاهده/تیمار	کنترل	شم	تجربی ۱	تجربی ۲	تجربی ۳
کف و مچ	0	0	۳۹/۳۷±۱۷/۳۳	۱۶/۲۵±۶/۳۲	0
ساعد	۲۵±۳/۵۰	۲۰/۷۵±۳/۶۱	۲۵/۵±۳/۳۱	۲۷± ۷/۰۱	۲۳/۲۵±۴/۷۲
بازو	۶۲/۳۷±۵/۷۱	۶۲/۲۵±۵/۸۲	۹/۳۷±۴/۲۷	۳۲/۲۵±۹/۴۷	۲۰/۷۵±۳/۳۸

جدول ۵. نتایج تحلیل آماری تعداد گلبول‌های قرمز خون در مناطق انگشت، کف و مچ دست، ساعد و بازو در گروه‌های کنترل، شم، تجربی ۱، تجربی ۲ و تجربی ۳ ($\bar{X} \pm SE$).

مشاهده/تیمار	کنترل	شم	تجربی ۱	تجربی ۲	تجربی ۳
انگشت	۱۸/۲۵±۲/۷۶	۱۹/۱۲±۲/۸۵	۶/۳۷±۱/۴۶	۶/۲۵±۱/۲۶	۹/۶۲±۱/۶۵
کف و مچ	۱۳± ۲/۷۱	۱۳/۷۵±۲/۹۹	۵/۲۵±۱/۳۵	۶/۳۷± ۱/۹۷	۱۰± ۱/۴۳
ساعد	۱۶/۲۵± ۲/۹۰	۱۶/۳۷±۳/۲۱	۲۷/۷۵±۴/۶۵	۱۵/۳۷± ۱/۹۱	۱۶/۷۵±۲/۹۹
بازو	۲۲/۸۷±۴/۷۹	۲۲/۸۷± ۴/۹۵	۱۲/۷۵± ۱/۷۲	۷/۶۲± ۱/۶۱	۱۸/۱۲±۱/۹۰

جدول ۶. نتایج تحلیل آماری تعداد سلول‌های مزانشیمی در حال تقسیم میتوز در مناطق انگشت و کف و مچ دست در گروه‌های کنترل، شم، تجربی ۱، تجربی ۲ و تجربی ۳ ($\bar{X} \pm SE$).

مشاهده/تیمار	کنترل	شم	تجربی ۱	تجربی ۲	تجربی ۳
انگشت	۳±۰/۷۰	۳/۲۵±۰/۵۹	۰/۷۵±۰/۲۵	۰/۵۰±۰/۱۸	۲/۶۲±۰/۴۹
کف و مچ	۴/۶۲±۱/۰۳	۴/۳۷±۰/۹۸	۰/۶۲±۰/۱۸	0	۲/۵۰±۰/۴۲

بحث

می‌یابد. به‌همین منظور مطالعات بسیاری بر روی تاثیرات سمیت‌زایی این نانو ذره در اندام‌های مختلف صورت گرفته است. تاکنون مطالعه‌ای بر روی اثرات نانو دی اکسید تیتانیوم

با افزایش کاربردهای نانو ذرات TiO_2 در زندگی بشر، احتمال بروز مسمومیت‌های ناشی از این ماده نیز افزایش

بر جوانه‌ی اندام حرکتی صورت نگرفته است و عمده کارها به بررسی اثر این ماده بر روی ریه، کبد، کلیه، طحال، قلب و مغز پرداخته‌اند. در این کار تحقیقاتی ما به بررسی اثر دی‌اکسید تیتانیوم ۱۰ نانومتر بر روی جوانه‌ی اندام حرکتی جلویی موش در شرایط *in vivo* پرداختیم. نتایج بررسی‌های اخیر نشان داد که نانو ذرات TiO_2 باعث القای آپوپتوز و استرس اکسیداتیو در سلول‌های اپیتلیال ریوی می‌شود (۲۱).

همان طور که در بررسی‌های ما TiO_2 در دوزهای پایین باعث تسریع آتروفیه شدن سلول‌ها در مناطق مختلف جوانه‌ی اندام حرکتی جلویی شد.

محققان در مطالعه‌ای به بررسی رشد سلول عصبی بر روی سطوح نانو ساختاری آناتاز TiO_2 پرداختند. اکسیدهای تیتانیوم فعالیت ضد التهابی دارد و ویژگی‌های الکتروشیمیایی که آن‌ها را مواد جاذب برای کاربردهای زیست پزشکی می‌سازد. در این مطالعه، سازگاری نانومتریک فازهای پوشیده شده از TiO_2 در دمای پایین با نورون‌ها در ۴ روز و ۱۰ روز کشت، با استفاده از چگالی‌های سلولی متفاوت برای سنجش بقای سلولی و گسترش آکسون بررسی شد. هدایت سوبستراها به وسیله‌ی لایه‌ی اکسید نانومتریک، غیرفعال نبود و به‌عنوان الکترودها استفاده شد. فیلم‌های TiO_2 نشان داد که نانو ساختارهای پوشیده شده با TiO_2 ، صرفاً والانس Ti^{+4} در فاز آناتاز و غیر متبلور می‌باشند. وقتی همه فیلم‌ها با پلی لیزین پوشیده شدند فرصت خوبی برای بقا و چسبیدن نورون‌ها حداقل به مدت ۱۰ روز در محیط کشت بود. عموماً آن‌ها رشد آکسون را در مقایسه با کشت سلولی در ظروف شیشه‌ای بروسلیکاتی با دندریت‌هایی که تاثیر پذیرتر از آکسون‌ها هستند، کاهش دادند (۲۲). همان‌طور که در بررسی‌های ما نیز در حضور TiO_2 تعداد سلول‌های مزانشیمی در حال تقسیم میتوز کاهش یافتند.

در مطالعه‌ای دیگر به بررسی سمیت بیوشیمیایی نانو ذرات آناتاز TiO_2 در موش‌ها پرداخته شد. در این بررسی، به

منظور ارزیابی بیشتر سمیت نانو ذرات TiO_2 ، نانو آناتاز TiO_2 ۵ nm به درون حفره شکمی موش‌های ICR هر روز به مدت ۱۴ روز تزریق شد. نتایج نشان دادند که با افزایش دوز این نانو ذرات، ضریب تجمع در کبد، کلیه و طحال کم کم افزایش یافت، در حالی که در ریه و مغز به تدریج کاهش یافت و در قلب تغییر کمتری داشت. به بیان دیگر تجمع تیتانیوم به ترتیب در کبد، کلیه، طحال، ریه، مغز، قلب می‌باشد. پارامترهای بیوشیمیایی سرم با دز کمتر نانو آناتاز TiO_2 تغییر کمتری را در مقایسه با موش‌های کنترل نشان داد، در حالی که با دز بیشتر شناساگرهای کبد از قبیل آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز، پروتئین توتال و سطح آلومین به طور چشمگیر افزایش یافت. شناساگرهای عملکرد کلیه از قبیل اسید اوریک و نیترژن اوره خون کاهش یافت، فعالیت شناساگرهای عملکرد عضله‌ی قلب از قبیل آمینو ترانسفراز آسپاراتات، کراتین کیناز، لاکتات دهیدروژناز، افزایش یافت. به‌طور کلی، نانو آناتاز TiO_2 در دوز بالاتر سبب آسیب جدی کبد، کلیه و عضله‌ی قلب در موش‌ها شد و موجب برهم خوردن تعادل قند و چربی خون گردید (۲۳).

نتایج یافته‌های ما تایید کننده‌ی این امر می‌باشد که نانو TiO_2 با تجمع خود در دوزهای پایین باعث رشد و تکثیر سلول‌ها شده و با اثرات سمیت‌زایی خود منجر به دژنره شدن و آتروفیه شدن سلول‌ها می‌شود. محققان در مطالعه‌ای دیگر به بررسی القای نوری نانو ساختار TiO_2 محلول در درمان سلول‌های سرطانی اپیتلیال سینه پرداختند. در این مطالعه، فعالیت زیستی القای نوری TiO_2 در روش تعیین شرایط درمان فوتوکاتالیتیک سلول‌های سرطانی و همچنین مکانیسم‌های مولکولی در این فرآیند مورد بررسی قرار گرفتند. MCF-7 و MDA-MB-468 سلول‌های اپیتلیال سرطان سینه کشت داده شده با استفاده از اشعه‌ی UV (طول موج ۳۵۰ نانومتر) به مدت ۲۰ دقیقه در حضور نانو ساختارهای تیتانیوم محلول با استفاده از تکنیک سل، ژل پرتو

روز در معرض قرار گرفتن، نانو ذرات TiO_2 از میان پوست نفوذ کرده و بافت‌های متفاوتی را تحت تاثیر قرار دادند و آسیب‌های پاتولوژیکی متنوعی را در چندین اندام اصلی ایجاد کردند. در این بررسی پوست و کبد بیشترین تغییرات پاتولوژیکی را نشان دادند (۲۵). در بررسی‌های ما مشاهده شد که در دوز پایین حضور TiO_2 در مراحل اولیه رشد و نمو جنینی، باعث افزایش قطر پوست مناطق مختلف جوانه‌ی اندام حرکتی شد که این افزایش در دز بالا به حداقل رسید.

نتیجه گیری

به این ترتیب نتایج به وجود پتانسیل دوگانه این نانو ذره در سمیت‌زایی و تحریک فرآیندهای رشد و نمو در موش سوری اشاره دارد. این ماده در دز پایین خاصیت سمیت‌زایی فراوانی داشته و با مهار آنزیم‌های موثر در رشد و نمو باعث نکروزه شدن بافت‌ها در موش سوری می‌شود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاری مسوولان محترم گروه زیست‌شناسی و دانشکده‌ی علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران در تامین امکانات اجرایی این طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- 1- Roco MC. Broader societal issues of nano technology. *J Nano Particles Res.* 2003; 5: 181-89.
- 2- Rittner MN. Market analysis of nanostructured materials. *American Ceramic Society Bulletin.* 2002; 81: 33-36.
- 3- Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Ghissassi FEL, Coglianò V. WHO International

درمانی شدند. دو تکنیک متفاوت به منظور بررسی تاثیرات بر روی سیکل سلولی و زیست پذیری کشت درمان به کار گرفته شد :

۱- آزمایش مجاز Propidium iodide = PI FACScan با یک جریان سائتومتريک) برای شناسایی تاثیرات درمان روی سیکل سلولی

۲- MTT assays برای آنالیز زیست‌پذیری سلولی که بیان دقیق درصدی از سلول‌ها را که بعد از درمان هنوز زنده و فعال هستند اجازه می‌دهد.

یک عمل انتخابی از هر دو نانو ذرات TiO_2 و فعال شدن فوتوکاتالیتیکالی تیتانیوم بر روی سلول‌های بدخیم-MDA-MB-468 مشاهده شد (۲۴). در مطالعات ما مشاهده شد که TiO_2 در دوزهای پایین باعث القای آتروفیه شدن سلول‌ها در مناطق مختلف جوانه‌ی اندام حرکتی جلوگیری شد.

در بررسی دیگر به مطالعه‌ی نفوذ و توانایی سمیت نانو ذرات TiO_2 به دنبال در معرض قرار گرفتن پوست بدون مو، در شرایط *in vivo* پرداختند. در این بررسی بعد از این که بر روی پوست گوش گونه‌ای از خوک به مدت ۳۰ روز مورد استفاده قرار گرفتند، نانو ذرات (60 nm و 4 nm) از میان لایه‌ی شاخی نفوذ کرده و در لایه‌ی عمیق اپیدرمیس مستقر شدند. علاوه بر این در موش‌های بدون مو بعد از ۶۰

Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *Lancet Oncology.* 2006; 7: 295-96.

4- Wang JX, Zhou GQ, Chen CY, et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett.* 2007; 168: 176-85.

- 5- Diebold U. The surface science of TiO₂. *J Surface Science Reports*. 2003; 48: 53-63.
- 6- Janisch R, Gopal P, Spaldin N. Transition metal-doped TiO₂ and ZnO -present status of the field. *J Physics*. 2005; 17: 657-89.
- 7- Mills A, Hunte S, Le J. An overview of semiconductor photocatalysis. *Photochem Photobiol A*. 1997; 108: 1-35.
- 8- Wang XI, Yu JC, Liu P, Wang X, Su W, Fu XI. Probing of photocatalytic surface sites on so /TiO₂ solid acid by in situ FT-IR spectroscopy and pyridine adsorption. *J Photochem Photobiol A*. 2006; 179: 339-47.
- 9- Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem Res Toxicol*. 2008; 21: 1871-77.
- 10- Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Anotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*. 2005; 113: 823-39.
- 11- Wlaschek M, Tantcheva-Por I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B*. 2001; 63: 41-51.
- 12- Shigenaga MK, Ames BN. Assays for 8-hydroxy-2-deoxyguanosine a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med*. 1991; 10: 211-16.
- 13- Takeda K, Suzuki K, Ishihara A, et al. Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *J Health Sci*. 2009; 55: 95-102.
- 14- Duan YM, Liu J, Ma LL, et al. Toxicological characteristics of nanoparticulate anatase titanium dioxide in mice. *Biomaterials*. 2010; 31: 894-99.
- 15- Rahman Q, Lohani M, Dopp E, et al. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ Health Perspect*. 2002; 110: 797-800.
- 16- Lu PJ, Ho IC, Lee TC. Induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by titanium dioxide in Chinese hamster ovary- K1 cells. *Mutat Res*. 1998; 414:15-20.
- 17- Afaq F, Abidi P, Matin R, Rahman Q. Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide. *J Appl Toxicol*. 1998; 18: 307-12.
- 18- Liu HT, Ma LL, Zhao JF, et al. Toxicity of nano-anatase TiO₂ to mice : liver injury, oxidative stress. *Toxicol Environ Chem*. 2010; 92: 175-86.
- 19- Ma LL, Liu J, Li N, et al. Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO₂ delivered to the abdominal cavity. *Biomaterials*. 2010; 31: 99-105.
- 20- Mohseni Kouchesfahani H, Parivar K. General histological, embryological and zoological microtechniques. alhossein Publishing Co., Tehran. 1999.
- 21- Plataki M, Koutsopoulos AV, Darvianaki K, Delides G, Siafakas NM, Bouros D. Expression of apoptotic and antiapoptotic markers in epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2005; 127: 266-74.

22- Castro J, Cruz A, Carballo M, et al. Neural Cell growth on TiO_2 anatase nanostructured surfaces. *Thin Solid Films*. 2009; 518: 160-70.

23- Huiting L, Linglan M, Jinfang Zh, et al. Biochemical toxicity of nano-anatase tio_2 particles in mice. *Biol Trace Elem Res*. 2009; 129: 170-80.

24- Lagopati N, Kitsiou PV, Kontos AI, et al. Photo- induced treatment of breast epithelial

cancer cells using nano structured titanium dioxide solution. *J Photochem Photobiol A*. 2010; 214: 215-23.

25- Jianhong W, Wei L, Chenbing X, et al. Toxicity and penetration of TiO_2 nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol Lett*. 2009; 191: 1-8.

Cytotoxic Effects of Nano-Titanium Dioxide on Forelimb Bud Development in NMRI Mouse Embryos In vivo

Hayati Roodbari N¹, Parivar K¹, Badiei B², Zolfaghari Barogh S¹

¹Dept. of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

²Dept. of Chemistry, School of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.

Correspond Author: Hayati Roodbari N, Dept. of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

E-mail: nasimhayati@yahoo.com

Received: 26 Jan 2013

Accepted: 7 Oct 2013

Background and Objective: Due to inclusion of nano titanium dioxide in substances such as sunscreens and detergents which may be used by pregnant mothers and regarding that the studies on the effects of such substances have not yet been clearly elucidated, therefore, we conducted this study to investigate the effect of TiO₂ on forelimb buds in mouse embryos.

Materials and Methods: In this study, five groups of forelimb buds including control, sham, experimental group 1 (using a dose of 30 mg/kg), experimental group 2 (using a dose of 150 mg/kg) and experimental groups 3 (using a dose of 500 mg/kg), were investigated. On day 11 of gestation, control group without the effect of TiO₂, sham group with injection of deionized water as TiO₂ solvent and experimental groups with injection of TiO₂ (10 nm particles) with doses of 30, 150 and 500 mg/kg mouse weight were examined. Then, on day 15 of gestation, embryos were removed from the mothers' body and their forelimb buds were amputated.

Results: The findings revealed a significant increase in doses 30 and 150 mg/kg in the total length of limb bud, skin thickness, the number of mesenchymal cells in fingers, degenerating chondrocyte cells in arm, and a significant decrease in the number of proliferating chondrocyte cells in arm, mesenchymal cells in palm and wrist, mitotic dividing mesenchymal cells in fingers and red blood cells in fingers. Meanwhile, it was found that the dose of 500 mg/kg led to a significant decrease in the total length of limb bud, skin thickness of arm, number of proliferating chondrocytes in arm, red blood cells in fingers and mesenchymal cells in palm and wrist.

Conclusion: The findings of this study revealed decreasing and increasing effects of cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles on the growth of forelimb bud in mouse embryos under in vivo conditions.

Keywords: Titanium dioxide nanoparticles, Cytotoxicity effect, Forelimb bud, Chondrogenesis, Mouse