

# بررسی اثرات تراژونیک نانودی اکسید تیتانیوم (TiO<sub>2</sub>) خوراکی بر مورفولوژی و ساختار سیستم اسکلتی جنین‌های موش NMRI در هفته‌های مختلف حاملگی

محمد حسن عبدی اردستانی<sup>۱</sup>، دکتر مرتضی انوری<sup>۲\*</sup>، دکتر عباس شاهدی<sup>۳</sup>، دکتر مریم یادگاری<sup>۳</sup>، آرزو خردمهر<sup>۴</sup>، صدیقه رستاقی<sup>۵</sup>

۱. کارشناس ارشد گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
۲. دانشیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
۳. استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
۴. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، مرکز ناباروری یزد، یزد، ایران.
۵. مربی گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۰۸

## خلاصه

**مقدمه:** با توجه به توسعه فناوری نانو و گسترش استفاده از نانومواد در زمینه‌های مختلف صنعت، بررسی اثرات مخرب آن بر سیستم‌های بیولوژیکی ضروری است. دی‌اکسید تیتانیوم (TiO<sub>2</sub>) در تولید رنگ‌های مختلف، لوازم آرایشی، سرامیک، فوتوکاتالیست‌ها، آب و فاضلاب و بسیاری از محصولات دیگر کاربرد دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر تراژونیکستی این نانوذره در هفته‌های مختلف بارداری موش NMRI انجام شد.

**روش کار:** این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۶ بر روی ۳۰ موش ماده نژاد NMRI (۳۰-۲۵ گرم، ۱۲-۸ هفته) انجام شد. موش‌ها به طور تصادفی به ۲ گروه کنترل و ۴ گروه مورد تقسیم شدند. بارداری با مشاهده پلاک واژینال (GD0) تأیید شد. دوز ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم محلول TiO<sub>2</sub> به صورت گاوژ دهانی از هفته اول تا روز هجدهم بارداری به موش‌های باردار خوراند. برای گروه‌های اول تا سوم به ترتیب فقط هفته‌های اول تا سوم و گروه چهارم کل دوره بارداری، نانوذرات گاوژ شد. گروه ششم با حلال گاوژ شد و گروه کنترل، آب شهر را بدون گاوژ دریافت کردند. در روز هجدهم بارداری جنین‌ها از لوله‌های رحم جدا و وزن، قد، دور سر و ناهنجاری‌های مورفولوژیک ثبت گردید و اختلالات اسکلتی جنین‌ها توسط رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و آلیسن بلو بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) و آزمون‌های کای دو، آنالیز واریانس یک‌طرفه و و کروسکال والیس انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** در مجموع در چهار گروه تجربی، کاهش قابل توجهی در وزن بدن و طول CR در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ( $p < 0/05$ ). همچنین تعداد قابل توجهی از ناهنجاری‌های ظاهری مانند جذب جنین، خونریزی، ناهنجاری‌های اندام و اختلالات اسکلتی در گروه‌های آزمون در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. مشاهدات نشان داد اثرات تراژونیک در گروهی که هفته دوم در معرض نانوذرات بودند، بیشتر بروز کرد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه حاضر سمیت و اثرات تراژونیک نانوذرات TiO<sub>2</sub> در موجودات زنده را ثابت می‌کند. بنابراین، مطالعات بیشتری برای پیش‌بینی اثرات سمی TiO<sub>2</sub> مورد نیاز است.

**کلمات کلیدی:** تراژونیک، تیتانیوم، نانوذرات، ناهنجاری‌های اسکلتی

\* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر مرتضی انوری؛ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران. تلفن: ۰۳۵-۱۸۲۴۷۰۸۵؛ پست الکترونیک: moanvari@yahoo.com

## مقدمه

نانوذرات (NP) یک گروه از مواد آلی و غیرآلی با محدوده اندازه ۱۰۰-۱ نانومتر هستند (۱). خواص این ذرات با حالت توده تفاوت زیادی داشته که از آن جمله می‌توان به فضای سطحی بزرگ، انحلال‌پذیری و فعالیت بیشتر، تحرک بسیار زیاد در بدن انسان و توانایی نفوذ به غشاء سلولی اشاره کرد. این امر باعث شده مقیاس نانو بیش از مقیاس‌های دیگر مورد توجه قرار گیرد (۲). از این رو در استفاده از نانوذرات باید به سمیت آنها توجه نمود، زیرا می‌توانند با پاسخ‌هایی چون التهاب مزمن و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن همراه باشند (۳). مطالعات نشان داده‌اند که نانوذرات با توجه به اندازه‌شان، قادر به عبور از سد‌های بیولوژیکی مانند غشاء و سد‌های خونی مغزی و جفت می‌باشند. این مسئله ممکن است منجر به تأثیرات سمی و پاسخ‌های التهابی در مغز و تخریب سیستم عصبی مرکزی شود (۴). یکی از نانوذرات اکسید فلزی پرکاربرد، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم می‌باشد. نانوذره دی اکسید تیتانیوم (TiO<sub>2</sub>)، پودر بی‌بو و غیر قابل اشتعالی است که به وفور تولید می‌شود و به طور گسترده‌ای در تعداد فزاینده‌ای از محصولات از جمله رنگ‌ها، افزودنی‌ها، ضد زنگ‌ها، لوازم آرایشی، مواد غذایی، پزشکی بیومتریال و غیره مصرف می‌شوند (۵). استفاده گسترده از نانوذره TiO<sub>2</sub> در صنعت و افزایش تقاضای آن در زندگی روزانه، نیاز به تحقیقاتی در مورد اثرات سمی بالقوه و احتمالی آن را تشدید می‌کند (۶). در سال‌های اخیر، مطالعات متعدد قطعاً نشان داده‌اند که قرار گرفتن در معرض نانوذرات TiO<sub>2</sub> اثرات منفی بر روی سیستم تنفسی و یا سیستم چرخه متابولیک موجودات می‌گذارد. سمیت ناشی از نانوذرات می‌تواند در زنان باردار تقویت شود. استنشاق یک مرتبه نانوذرات TiO<sub>2</sub> باعث هیچ واکنشی در مورد غیر باردار نمی‌شود، در حالی که همان مواجهه باعث التهاب حاد و مداوم ریه‌ها در موش BALB/c باردار شده است (۷). اگر در این دوره رویان آسیب ببیند، بهبودی آن دشوار و یا غیرممکن خواهد بود (۸). حدود ۵۰ ماده شیمیایی به عنوان ترانژن انسان تأیید شده است و تصور می‌شود حدود ۱۰٪ از نقائص هنگام تولد با عوامل محیطی در

ارتباط باشد (۹). به همین جهت امروزه مطالعات متعددی به بررسی اثرات ترانژنیک نانوذرات اختصاص یافته که سهم نانوذرات تیتانیوم در این بین کمتر است. از این رو مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ترانژنیستی این نانوذره بر جنین‌های موش نژاد BALB/c به دنبال مصرف خوراکی آن توسط مادر انجام شد.

## روش کار

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۶ بر روی موش‌های NMRI در مرکز ناباروری یزد انجام شد. تیتانیوم مورد استفاده در این پژوهش از نوع تیتانیوم دی اکسید ۳۰ نانومتری مخلوط فرم آنتاز و روتیل (۲۰٪ روتیل + ۸۰٪ آنتاز) تهیه شده از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان می‌باشد (۱۰). حلال نانوذرات تیتانیوم فسفات بافر سالین بوده که محلول به صورت ۵ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر از حلال فسفات بافر سالین تهیه شد (۱۱).

در این مطالعه از موش‌های سالم نژاد NMRI در سن ۸-۱۲ هفته با وزن ۲۵-۳۰ گرم نگهداری شده در اتاق حیوانات مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری یزد استفاده شد. ۳۰ موش ماده در این آزمایش استفاده شد که در روزهای متوالی با نرها جفت انداخته شد و روز مشاهده پلاک واژینال برای هر کدام به عنوان روز صفر بارداری GDO در نظر گرفته شد. ماده‌های باردار به‌طور انفرادی در قفس‌های پلاستیکی با آب و غذای کافی و شرایط دمایی ۲۲-۲۶ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰-۵۰٪ و سیکل تاریک و روشن ۱۲ ساعته نگهداری شدند (۱۲).

موش‌ها به طور تصادفی به شش گروه پنج تایی: کنترل (گاوژ با آب شهر)، شم (گاوژ با حلال نانو PBS فسفات بافر سالین) و گروه‌های هدف (گروه اول، دوم و سوم و چهارم) تقسیم شدند. محلول ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (دوز متوسط) تیتانیوم دی اکسید با حلال فسفات بافر سالین برای گروه‌های هدف در طی روزهای بارداری، هر روز بین ساعت ۹-۱۱ صبح با سرنگ از طریق لوله معدی گاوژ شد. گروه اول، هفته اول بارداری گاوژ می‌شوند، گروه دوم هفته دوم، گروه سوم هفته سوم و گروه چهارم هدف، کل طول بارداری را گاوژ شدند.

در روز هجدهم، موش‌های ماده باردار با دررفتگی گردن کشته (با توجه به رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات) و

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) انجام شد. به منظور مقایسه و ارزیابی متغیرهای کیفی از آزمون کای دو و برای متغیرهای کمی در صورت نرمال بودن داده‌ها از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و در صورت غیر نرمال بودن از آزمون کروسکال والیس استفاده شد. میزان  $p$  کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

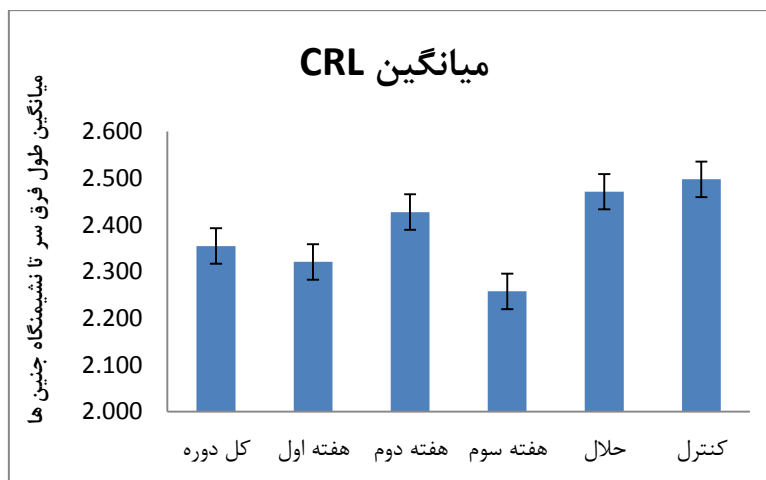
### یافته‌ها

در مشاهدات ماکروسکوپی مواردی نظیر وزن جنین، طول فرق سری- نشیمنگاهی و محیط دور سر و همچنین تغییرات وزن مادران قبل و بعد از حاملگی مورد بررسی قرار گرفت.

میانگین وزن، C.R.L و دور سر جنین‌های ۱۸ روزه که مادران آنها نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید خوراکی با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرده بودند، نسبت به گروه کنترل و شم که این ماده را دریافت نکرده بودند، کاهش معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۱). همچنین بر اساس آزمون کروسکال والیس، از بین گروه‌های مورد مطالعه، گروه هفته سوم میانگین وزن جنین‌های کمتری نسبت به سایر گروه‌ها داشت. میانگین محیط دور سر در گروه هفته سوم (۲/۸۵ سانتی‌متر) کمتر از سایر گروه‌های آزمون بود.

سپس ناحیه شکم تشریح و جنین‌ها یکی یکی خارج شده و داخل پتری دیشی حاوی سرم فیزیولوژی روی ترازوی اسکالتس وزن شدند. طول فرق سر تا نشیمنگاه، فاصله جلوپوی- عقبی و طرفی سر جنین با کولیس اندازه‌گیری و محیط سر جنین‌ها محاسبه شد. همچنین تعداد جنین‌ها، مرگ و حذف جنینی، ناهنجاری‌های اسکلتی و اندام‌ها، زوائد انگشتی، ناهنجاری‌های مجمله و ستون مهره‌ها، خونریزی‌های زیر جلدی، جنین آتروفی و سایر ناهنجاری‌های مورفولوژیک ثبت و اندازه‌گیری شد (۱۳). این بخش بر اساس پروتکل OECD-GLP انجام گرفت (۱۳).

در آزمایشات هیستوپاتولوژیک، جهت بررسی میزان تراکم استخوان، نحوه استخوان‌سازی، بررسی مراکز استخوان‌سازی، تأخیر در رشد و یا نقایص مادرزادی در اندام‌ها و استخوان‌ها و بررسی تکامل طبیعی استخوان‌ها و غضروف‌ها از روش مننگولا و همکاران (۲۰۰۱) و جلالی و همکار (۲۰۰۴) با رنگ‌آمیزی دوگانه آلیزارین رد اس (جهت استخوان) و آلیسن بلو (جهت غضروف) استفاده شد (۱۴، ۱۵). طی این روش، استخوان‌ها با رنگ آلیزارین رد به رنگ قرمز و غضروف‌ها با رنگ آلیسن بلو به رنگ آبی در می‌آید. نمونه‌ها پس از رنگ‌آمیزی و شفاف شدن جهت مطالعه استخوان‌ها و غضروف‌ها توسط میکروسکوپ استریو مورد بررسی قرار گرفتند و با استفاده از میکروسکوپ استریو دوربین‌دار، عکس‌برداری شدند.



نمودار ۱- مقایسه میانگین CRL بین گروه‌ها

با توجه به آزمون کای دو، درصد جنین‌های مرده و جذب شده و نرخ مرگ‌ومیر در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ). بیشترین نرخ مرگ‌ومیر در گروهی که کل دوره را گاوژ نانوذره تیتانیوم شده بودند، با ۱۵ جنین مرده (۲۴/۲٪) مشاهده شد (جدول ۱).

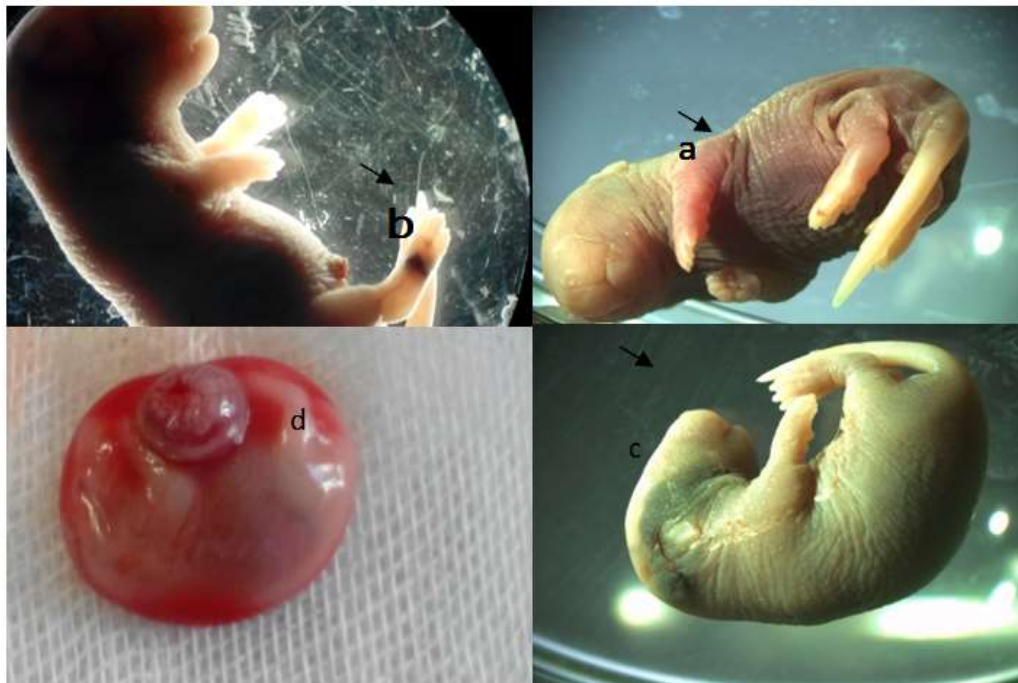
میزان باروری در موش‌های مادری که در اولین جفت‌اندازی پس از تشکیل پلاک واژینال و تأیید بارداری شروع به تیمار با نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید شدند، تا ۸۰٪ کاهش یافت. از ۵ موش با پلاک واژینال در گروه‌های تیمار در هفته اول و کل دوره که از روز GD0 گاوژ شدند، تنها یک موش بارداری خود را ادامه داد.

جدول ۱- مقایسه فراوانی جنین مرده و زنده میان گروه‌ها

گروه	N	تعداد جنین زنده	تعداد جنین مرده
گاوژ کل دوره	۶۲	۴۷ (۷۵/۸)	۱۵ (۲۴/۲)
گاوژ هفته اول	۵۹	۵۴ (۹۱/۵)	۵ (۸/۵)
گاوژ هفته دوم	۵۸	۵۵ (۹۴/۸)	۳ (۵/۲)
گاوژ هفته سوم	۵۰	۴۴ (۸۸)	۶ (۱۲)
گاوژ حلال	۶۰	۶۰ (۱۰۰)	۰ (۰)
گروه کنترل	۶۰	۶۰ (۱۰۰)	۰ (۰)
مجموع	۳۴۹	۳۲۰ (۹۱/۶)	۲۹ (۸/۴)

بر اساس آزمون کای دو، فراوانی ناهنجاری‌های خونریزی دهنده شامل خونریزی‌های زیر جلدی، خونریزی داخلی و خونریزی آمنیون، بین گروه‌های مختلف آزمون با گروه‌های کنترل و شم تفاوت آماری معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ) (جدول ۲). فراوانی این ناهنجاری‌ها در گروه هفته دوم با ۱۰ مورد (۱۷/۲۴٪) بیشتر از سایر گروه‌ها بود. شکل ۱ نشان‌دهنده نمونه‌ای از خونریزی پوستی و خونریزی داخلی و خونریزی آمنیون می‌باشد.

بر اساس آزمون کای دو، فراوانی ناهنجاری‌های خونریزی دهنده شامل خونریزی‌های زیر جلدی، خونریزی داخلی و خونریزی آمنیون، بین گروه‌های مختلف آزمون با گروه‌های کنترل و شم تفاوت آماری معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ) (جدول ۲). فراوانی این ناهنجاری‌ها در گروه هفته دوم با ۱۰ مورد (۱۷/۲۴٪) بیشتر از سایر گروه‌ها بود. شکل ۱ نشان‌دهنده نمونه‌ای از خونریزی پوستی و خونریزی داخلی و خونریزی آمنیون می‌باشد.



شکل ۱- خونریزی منشر زیر جلد (a) و هماتوم زیر جلدی ناحیه پا (b) در جنین‌های گروه هفته دوم. خونریزی داخلی در ناحیه گردن جنین تیمار شده در هفته اول (c) خونریزی آمنیون گروه تیمار شده در هفته دوم (d)

جدول ۲- سنجش فراوانی ناهنجاری‌های خونریزی دهنده به منظور مقایسه میان گروه‌ها

گروه کنترل	گاوژ حلال	گاوژ هفته سوم	گاوژ هفته دوم	گاوژ هفته اول	گاوژ کل دوره	ناهنجاری‌های خونریزی دهنده
(۰)۰	۱ (۱/۶۶)	۷ (۱۴)	۱۰ (۱۷/۲۴)	۷ (۱۱/۸۶)	۶ (۹/۶۷)	دارد
(۱۰۰)۶۰	۵۹ (۹۸/۳۳)	۴۳ (۸۶)	۴۸ (۸۲/۷۵)	۵۲ (۸۸/۱۳)	۵۶ (۹۰/۳۲)	ندارد

بر اساس آزمون کای دو، درصد فراوانی بروز ناهنجاری‌های اندام و زوائد انگشتی شامل پیش نامناسب و کوتاهی اندام‌های فوقانی و تحتانی، بین گروه‌های کنترل و شم با گروه‌های آزمون اختلاف آماری معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ). بر اساس جدول ۳، بین درصد فراوانی بروز این ناهنجاری‌ها در گروه کل دوره با گروه کنترل و شم نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت

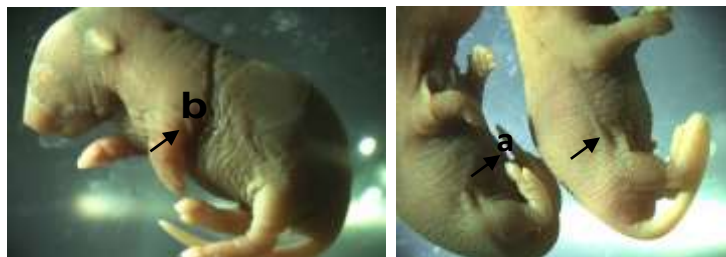
بر اساس آزمون کای دو، درصد فراوانی بروز ناهنجاری‌های اندام و زوائد انگشتی شامل پیش نامناسب و کوتاهی اندام‌های فوقانی و تحتانی، بین گروه‌های کنترل و شم با گروه‌های آزمون اختلاف آماری معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ). بر اساس جدول ۳، بین درصد فراوانی بروز این ناهنجاری‌ها در گروه کل دوره با گروه کنترل و شم نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت

جدول ۳- مقایسه درصد فراوانی ناهنجاری‌های اندام‌ها و زوائد انگشتی جنین‌ها

گروه کنترل	گاوژ حلال	گاوژ هفته سوم	گاوژ هفته دوم	گاوژ هفته اول	گاوژ کل دوره	ناهنجاری‌های اندام‌ها و زوائد انگشتی
(۰)۰	(۰)۰	۶ (۱۲)	۱۲ (۲۰/۶۸)	۱۱ (۱۸/۶۴)	۱۳ (۲۰/۹۶)	دارد
(۱۰۰)۶۰	(۱۰۰)۶۰	۴۴ (۸۸)	۴۶ (۷۹/۳۱)	۴۸ (۸۱/۳۵)	۴۹ (۷۹/۰۳)	ندارد

به ترتیب ۱۳ جنین (۲۰/۹۶٪) از جنین‌های گروه تیمار در کل دوره دارای ناهنجاری‌های اندام بودند. همچنین در گروه‌های تیمار در هفته اول، دوم و سوم

به ترتیب ۱۳ جنین (۲۰/۹۶٪)، ۱۲ (۲۰/۶۸٪) و ۱۱ (۱۸/۶۴٪) از جنین‌های گروه تیمار در کل دوره دارای ناهنجاری‌های اندام بودند. همچنین در گروه‌های تیمار در هفته اول، دوم و سوم



شکل ۲- ناهنجاری اندام تحتانی و فوقانی گروه تیمار در هفته دوم (a) ناهنجاری اندام فوقانی گروه تیمار در هفته اول (b)

اول ۳۲ مورد (۱۸/۰۷٪) و در گروه شم ۲ مورد (۱/۱۱٪) بود که بیشترین فراوانی در گروه تیمار در کل دوره بود که پرواضح است تنها گروهی که تمام بارداری را در معرض نانوذرات دی اکسید تیتانیوم قرار گرفت، همین گروه بود و به طبع آن، احتمال بروز ناهنجاری در این گروه بیشتر خواهد شد (جدول ۴).

بر اساس آزمون کای دو، فراوانی بروز ناهنجاری‌های مختلف بین گروه‌های آزمون و کنترل و شم تفاوت معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ). فراوانی بروز مجموع ناهنجاری‌ها به ترتیب در گروه تیمار در کل دوره ۸۳ مورد (۴۴/۶۲٪)، تیمار در هفته دوم ۳۶ مورد (۲۰/۶۸٪)، تیمار در هفته سوم ۲۹ مورد (۱۹/۳۳٪)، تیمار در هفته

جدول ۴- فراوانی مجموع ناهنجاری‌ها به منظور مقایسه میان گروه‌ها

گروه کنترل	گاوژ حلال	گاوژ هفته سوم	گاوژ هفته دوم	گاوژ هفته اول	گاوژ کل دوره	مجموع ناهنجاری‌ها
(۰)۰	۲ (۱/۱۱)	۲۹ (۱۹/۳۳)	۳۶ (۲۰/۶۸)	۳۲ (۱۸/۰۷)	۸۳ (۴۴/۶۲)	دارد

تفاوت معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ). این ناهنجاری‌ها به‌صورت اختلاف غضروف و استخوان (۲/۱۹٪)، تأخیر در

فراوانی ناهنجاری‌های اسکلتی و غضروفی بین گروه‌های آزمون با گروه‌های شم و کنترل

(۰.۱/۶۴) و انحراف ستون مهره‌ها (۰.۷/۶۹) بروز کرد.

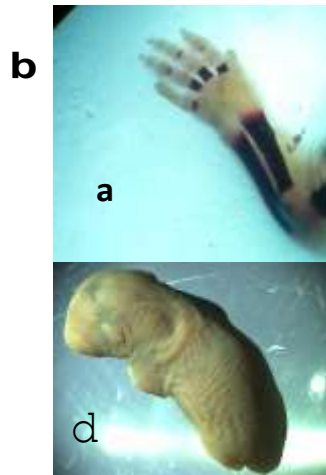
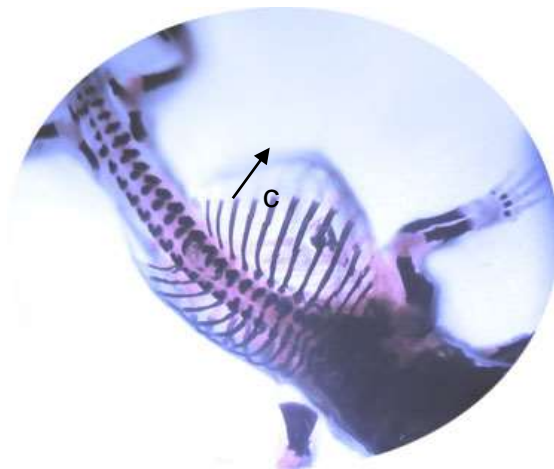
بسته شدن درزهای جمجمه (۰.۴/۹۴)، افزایش انحنای کمری (۰.۵/۴۹)، اسپاینا بیفیدا (۰.۱/۰۹)، اگزانسفالی

جدول ۵- مقایسه فراوانی ناهنجاری‌های اسکلتی جنین‌ها میان گروه‌ها

گروه کنترل	گاوژ حلال	گاوژ هفته سوم	گاوژ هفته دوم	گاوژ هفته اول	گاوژ کل دوره	ناهنجاری‌های اسکلتی و غضروفی
۰ (۰)	۱ (۱/۶۶)	۱۶ (۳۲)	۲۳ (۳۹/۶۵)	۲۲ (۳۷/۲۸)	۲۲ (۳۵/۴۸)	دارد
۶۰ (۱۰۰)	۵۹ (۹۸/۳۳)	۳۴ (۶۸)	۳۵ (۶۰/۳۴)	۳۷ (۶۲/۷۱)	۴۰ (۶۴/۵۰)	ندارد

دست در گروه کل دوره در مقایسه با گروه حلال را نشان می‌دهد.

شکل ۳، اختلال در استخوانی شدن مهره‌های کمری و عدم استخوانی شدن استخوان‌های بندهای دوم انگشتان



شکل ۳- مقایسه تأخیر در استخوانی شدن استخوان‌های بند دوم دست گروه کنترل (a) و هفته دوم (b) اشکال در تشکیل مهره‌های کمری (c) انحراف ستون مهره‌ها (d)

## بحث

مطالعه هر سه پارامتر اندازه‌گیری و میانگین این پارامترها بین گروه‌های مختلف آزمون و کنترل مقایسه شد.

در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری بین میانگین وزن بدن جنین‌ها در گروه‌های آزمون با گروه کنترل مشاهده شد، این تفاوت به وضوح کاهش وزن، کاهش طول بدن و دور سر جنین‌های گروه‌های تیمار شده با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم را نشان داد ( $P < 0.05$ ). بیشترین تأثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر وزن جنین‌ها در گروه تیمار در هفته سوم بود.

نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در دوزهای پایین خاصیت سمیت‌زایی فراوانی بر جنین‌ها داشته و با مهار آنزیم‌های مؤثر بر رشد و نمو و همچنین ایجاد رادیکال‌های آزاد،

نانومواد به دلیل اندازه‌های نانومتری‌شان، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی متفاوتی نسبت به مقیاس ماکرومتری دارند، زیرا مهم‌ترین عاملی که در این مقیاس تغییر می‌کند، افزایش نسبت سطح به حجم است. این عامل باعث تغییر رفتار اتم‌های ذره و تغییر تعامل ماده با سایر مواد می‌شود (۵).

امروزه آلودگی‌های ناشی از نانوذرات به‌عنوان مسأله‌ای جدید و خطرناک مطرح شده است (۱۶). نانوذرات TiO<sub>2</sub> به‌عنوان یک ماده بسیار ریز می‌تواند از طریق راه‌های مختلف مانند تنفس، خوردن و پوست به بدن انسان وارد شود (۱۷). برای ارزیابی رشد جنینی از شاخص‌های مختلفی از جمله طول فرق سر تا نشیمنگاه (CRL)، وزن و محیط دور سر استفاده می‌شود. در این

باعث آپوپتوز و نکروزه شدن بافت‌ها می‌شود (۱۸). تأثیر نانوذرات بر جفت نیز باعث فعال‌سازی نوتروفیل و التهاب سیستمیک شده که منجر به اختلال در عملکرد جفت، سقط جنین و محدودیت رشد جنین خواهد شد (۱۹).

مطالعه حاضر نشان داد نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید بر فراوانی حذف و مرگ جنینی تأثیر معناداری دارد ( $p < 0.05$ )، تفاوت تعداد جنین‌ها در گروه‌های آزمون و کنترل معنادار نبود. میزان مرگ‌ومیر جنین‌ها در گروه تیمار در کل دوره بارداری به‌طور چشم‌گیری بالاتر از سایر گروه‌ها بود. نرخ مرگ‌ومیر در این گروه  $24/19\%$  بود که در مقایسه با سایر گروه‌های آزمون نیز بالاتر بود. هیچ مرگ‌ومیر و حذف جنینی در گروه‌های کنترل و شم مشاهده نشد.

استرس اکسیداتیو در جفت باعث اختلال در عملکرد جفت و القاء عوارض بارداری می‌شود. گزارشات فراوانی در مورد نانومواد از ایجاد استرس اکسیداتیو که به نوبه خود باعث بروز پاسخ التهابی و مرگ سلولی می‌شود، وجود دارد (۲۰-۲۵).

مطالعه مانو و همکاران (۲۰۱۲) که به بررسی اثر  $TiO_2$  بر سمیت‌زایی و بیان ژن در لاین‌های سلولی انسانی پرداخته شد، نشان داد نانوذرات بدون پوشش  $TiO_2$  به انباشته شدن در محیط‌های آبی تمایل دارند و این انباشته شدن موجب کاهش زیست‌پذیری سلولی و القاء بیان ژن‌های مربوط به استرس از قبیل به رمز درآوردن اینترلوکین ۶ و شوک حرارتی پروتئین  $B70$  می‌شود. این تحقیق نشان داد که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، پاسخ‌های التهابی و شوک حرارتی را القاء می‌کند (۲۶).

در مطالعه حاضر ناهنجاری‌های اندام، یکی از بیشترین ناهنجاری‌های رخ داده در پی تیمار موش‌های مادر با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در هفته‌های مختلف بارداری بود؛ بدین ترتیب که  $23/07\%$  از کل ناهنجاری‌های گروه‌ها را به خود اختصاص داد.

جنین در حال رشد نسبت به سطوح بالایی از اکسیژن فعال (ROS) به‌خصوص در اندام‌های اولیه بسیار حساس است (۲۷). وجود سطح بالایی از اکسیژن فعال (ROS)، تغییر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ایجاد استرس اکسیداتیو، باعث سمیت و آسیب جنینی می‌شود (۲۸).

در مطالعه رودباری و همکاران (۲۰۱۴) با مقایسه متغیر-های مورد مطالعه به صورت میکروسکوپی، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده شد که بیانگر وجود آثار سمیت‌زایی بر جوانه اندام حرکتی جلویی موش سوری بود (۱۶). بنابراین بر اساس شواهد و مطالعات گذشته، بروز ناهنجاری در اندام‌ها در روزهای اورگانوژنز و رشد در اثر مواجهه با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم می‌تواند نگران‌کننده باشد (۸-۱۲).

یکی دیگر از ناهنجاری‌هایی که در مطالعه حاضر به چشم می‌آید، خونریزی‌های داخلی و پوستی و خونریزی آمنیون است. در بین این خونریزی‌ها، هماتوم پوستی از شیوع بیشتری برخوردار بود. در مطالعه زارچی و همکاران (۲۰۱۳) نانوذرات با توجه به دوز استفاده شده از آن توانست به طور مؤثری در عملکرد انعقادی پلاکت‌ها که شامل تجمع پلاکت‌ها، چسبیدن پلاکت‌ها به همدیگر و چسبیدن پلاکت‌ها به فیبرینوژن و کلاژن می‌باشد، اختلال ایجاد کند. این اثر بازدارندگی می‌تواند مربوط به تغییر ساختمانی اینتگرین سطح پلاکت‌ها و فسفوپروتئین موجود در پلاکت‌ها باشد. نانوذرات می‌توانند داخل پلاکت‌ها نفوذ کرده و فضاهای واکوئلی و گرانول‌ها را اشغال نموده و مانع گسترش هیالوپلاسمیک و کاهش تجمع پلاکت‌ها شوند. پلاکت‌ها پس از تماس با ورود نانوذرات، لیز نمی‌شوند و آزاد نشدن LDH داخل پلاکتی این موضوع را ثابت می‌کند. اگرچه نانوذرات نقش مخربی بر میتوکندری‌ها داشته و با ایجاد رادیکال‌های آزاد و اکسیژن آزاد، سبب آسیب‌های سلولی می‌شوند، ولی نتایج مطالعات نشان داد که عامل دوز مصرفی، نقش مهمی در تغییر تعداد سلول‌ها دارد (۲۹). مطالعه قریب و همکاران (۲۰۱۵) با محوریت ترانژولوزی که با تزریق داخل صفاقی فرم آنتاز نانوذره  $TiO_2$  در موش‌های آلبینو باردار انجام دادند، تأثیر این نانوذره بر مادر و جنین در طول بارداری و شیردهی ثبت شد. ناهنجاری‌های خونریزی دهنده در این مطالعه به خونریزی‌های پوستی و داخلی مربوط می‌شود.

در مطالعه حاضر تزریق داخل صفاقی  $TiO_2$  به رت‌های باردار منجر به اثرات خفیف در شکل‌گیری اسکلتی در جنین در حال رشد و فرزندان مانند عدم استخوان‌سازی

بیشترین ناهنجاری‌ها در این دوره را ناهنجاری‌های اسکلتی (۳۲٪) تشکیل داد.

مطالعات اخیر نشان داده‌اند نانوذرات TiO<sub>2</sub> هنگام ورود به درون سلول زنده با به راه انداختن مکانیسم‌های التهابی و مرگ آپوپتوزی و نیز با ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن باعث ایجاد سمیت، تغییر کارکرد و در نهایت مرگ سلولی می‌شوند (۳۱).

مشاهدات گذشته بیان ژن‌های مرتبط با فاز حاد و پاسخ-های التهابی را در جنین‌ها در پی مواجهه مادران تأیید می‌کنند. همچنین انتقال سیتوکین‌های التهابی مادر از طریق جفت نشان داده شده است (۳۲). بنابراین فعال شدن سیستم ایمنی بدن مادر (در صورت عدم وجود عوامل بیماری‌زا) در طول بارداری ممکن است تأثیر قابل توجهی در الفاء ناهنجاری‌های ساختاری و عملکردی در فرزندان داشته باشد (۳۳).

### نتیجه‌گیری

نانوذرات دی اکسید تیتانیوم اثرات تراژونیک بر جنین در هفته‌های مختلف دارد و بر سیستم‌های اسکلتی و عصبی تأثیر بسزایی دارد. همچنین این ماده باعث کاهش رشد جنینی و کاهش وزن جنین‌ها در دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن مادر می‌شود. اختلالات خونریزی دهنده این نانوذره در ارتباط با سیستم خونی جنین مشهود است. ناهنجاری‌های جنینی این ماده به دلیل اندازه بسیار ریز و خصوصیات سطحی در هفته دوم بارداری موش بیشتر به چشم می‌خورد.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از اساتید محترم گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی یزد و پرسنل محترم مرکز تحقیقات نابروری یزد که در مراحل طرح ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

جمجمه و دنده‌ها و مهره‌ها شد. بررسی مورفولوژیکی جنین‌ها نشان داد که نانوذرات TiO<sub>2</sub> باعث عقب ماندگی رشد، کاهش در وزن بدن جنین، طول بدن و طول دم جنین‌ها می‌شود. نتایج نشان داد که قرار گرفتن در معرض نانوذرات TiO<sub>2</sub> قبل از تولد باعث افزایش قابل توجهی در پراکسیداسیون لیپیدی در کبد و مغز نسبت به گروه کنترل می‌شود (۳۰).

برخی مطالعات نشان داده‌اند که نانوذره اکسید روی در غلظت‌های مختلف بر جنین در حال رشد موش نژاد NMRI تأثیر گذاشته و باعث کاهش رشد و تأخیر در تشکیل اجسام مهره‌های می‌شود و نقش مهم این عنصر در کنترل تقسیم، تکثیر و تمایز را مطرح می‌کند (۱۶-۱۴) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت.

در مطالعه حاضر بیشترین تأثیر سمی نانوذرات TiO<sub>2</sub> در تیمار هفته اول مادران در کاهش میزان و باروری آنها نشان داده شد؛ به طوری که میزان باروری در گروه‌های تیمار هفته اول و کل دوره که از روز اول بارداری گاوژ تیتانیوم می‌شدند، ۷۵٪ کاهش پیدا کرد و در جفت‌اندازی اول از مجموع ۵ مادر با شناسایی پلاک واژینال، تنها یک مادر باردار شد. در مطالعه حاضر فراوانی ناهنجاری‌های اسکلتی (۳۹/۶۵٪) و خونریزی دهنده (۱۷/۲۴٪) در گروه تیمار در هفته دوم بیشتر از سایر گروه‌ها بود که می‌تواند به دلیل رشد و تکامل سیستم اسکلتی در این دوره جنینی باشد.

در مطالعه حاضر در مجموع انواع ناهنجاری‌های اسکلتی، خونریزی دهنده و اندام‌ها، گروه تیمار در هفته سوم کمترین فراوانی را نشان داد و این می‌تواند به دلیل تکامل بیشتر اندام‌ها و ارگان‌ها در این دوره باشد که جنین تأثیر کمتری از تراژون‌ها می‌بیند. اما بروز همین میزان ناهنجاری در این هفته از بارداری قابل توجه است و می‌تواند نشانه سمیت بالای این ماده در این دوز باشد.



1. Vishwas M, Sharma SK, Rao KN, Mohan S, Gowda KA, Chakradhar RP. Influence of surfactant and annealing temperature on optical properties of sol-gel derived nano-crystalline TiO<sub>2</sub> thin films. *Spectrochim Acta Part A Mol Biom Spectrosc* 2010;75(3):1073-7.
2. Borm PJ, Krelinc W. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles--potential implications for drug delivery. *J Nanosci Nanotechnol* 2004; 4(5):521-31.
3. Warheit DB, Hoke RA, Finlay C, Donner EM, Reed KL, Sayes CM. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO<sub>2</sub> particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett* 2007; 171(3):99-110.
4. Klaine SJ, Alvarez PJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, et al. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem* 2008;27(9):1825-51.
5. Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;72(2):370-7.
6. Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res* 2009;69(22):8784-9.
7. Fedulov AV, Leme A, Yang Z, Dahl M, Lim R, Mariani TJ, et al. Pulmonary exposure to particles during pregnancy causes increased neonatal asthma susceptibility. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38(1):57-67.
8. Yeh GC, Taoc PL, Chen JY, Lai MC, Gao FS, Hud CL. Dextromethorphan attenuates morphine withdrawal syndrome in neonatal rats passively exposed to morphine. *Eur J Pharmacol* 2002;453(2-3):197-202.
9. Volpe JJ. Teratogenic effects of drugs and passive addiction. In: Volpe, J.J. (Ed.), *Neurology of the Newborn*; W.B. Saunders, Philadelphia, PA; 1995. pp. 811 -850
10. Vasantharaja D, Ramalingam V, Aadinaath Reddy G. Oral toxic exposure of titanium dioxide nanoparticles on serum biochemical changes in adult male Wistar rats. *Nanomed J* 2015;2(1):46-53.
11. Meena R, Kajal K, Paulraj R. Cytotoxic and genotoxic effects of titanium dioxide nanoparticles in testicular cells of male Wistar rat. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; 175(2):825-40.
12. York RG, Brown WR, Girard MF, Dollarhide JS. Oral (drinking water) developmental toxicity study of ammonium perchlorate in New Zealand white rabbits. *Int J Toxicol* 2001; 20(4):199-205.
13. Nikfar S, Farshchi A, Visser R. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). New York: Elsevier Inc; 1982.
14. Menegola E, Broccia ML, Giavini E. Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage. *Teratology* 2001; 64(3):125-33.
15. Jalali M, Fazel AR. New aspect of skeleton differential staining by Alzarin Red S and Alcian Blue. *Pharmaceut Sci* 2004; 10(1):767-75. (Persian).
16. Cui Y, Liu H, Ze Y, Zengli Z, Hu Y, Cheng Z, et al. Gene expression in liver injury caused by long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in mice. *Toxicol Sci* 2012;128(1):171-85.
17. Hong F, Wang L, Yu X, Zhou Y, Hong J, Sheng L. Toxicological effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticle-induced myocarditis in mice. *Nanoscale Res Lett* 2015;10(1):326.
18. Hayati Roodbari N, Parivar K, Badiei B, Zolfaghari Barogh S. Cytotoxic effects of nano-titanium dioxide on forelimb bud development in NMRI mouse embryos in vivo. *J Zanzan Univ Med Sci Health Serv* 2014;22(91):11-24. (Persian).
19. Bacchetta R, Santo N, Fascio U, Moschini E, Freddi S, Chirico G, et al. Nano-sized CuO, TiO<sub>2</sub> and ZnO affect *Xenopus laevis* development. *Nanotoxicology* 2012;6(4):381-98.
20. Sheng L, Wang X, Sang X, Ze Y, Zhao X, Liu D, et al. Cardiac oxidative damage in mice following exposure to nanoparticulate titanium dioxide. *J Biomed Mater Res Part A* 2013;101(11):3238-46.
21. Lamoureux DP, Kobzik L, Fedulov AV. Customized PCR-array analysis informed by gene-chip microarray and biological hypothesis reveals pathways involved in lung inflammatory response to titanium dioxide in pregnancy. *J Toxicol Environ Health Part A* 2010;73(9):596-606.
22. Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM. Pulmonary toxicity study in rats with tree forms of ultrafine-TiO<sub>2</sub> particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* 2007;230(1):90-104
23. Yan J, Lin B, Hu C, Zhang H, Lin Z, Xi Z. The combined toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles and bisphenol A on zebrafish embryos. *Nanoscale Res Lett* 2014;9(1):406.
24. Liu X, Sun J. Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress via JNK/P53 and NF-κB pathways. *Biomaterials* 2010;31(32):8198-209.
25. Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett* 2008; 180(3):222-9.
26. Mano SS, Kanehira K, Sonezaki S, Taniguchi A. Effect of polyethylene glycol modification of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on cytotoxicity and gene expressions in human cell lines. *Int J Mol Sci* 2012;13(3):3703-17.
27. Aillon KL, Xiea Y, El-Gendy N, Berkland CJ, Forresta ML. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61(6):457-66.
28. Ornoy, A.; Zaken, V. and Kohen, R. (1999): Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos in vitro: reduction in antioxidant enzymes and LMWA may be the causative factor for increased anomalies. *Teratology* , 60:376-86.29. 29.

29. Rezaei-Zarchi S, Taghavi-Foumani MH, Razavi Sheshdeh SA, Negahdary M. The effect of silver nanoparticles on blood cells in male rats. *Iran Blood Transfus Organ* 2013; 10(2):147-53.
30. Ghareeb AW, Hamida H, El Bakry A, Hmela HA. Teratogenic effects of the titanium dioxide nanoparticles on the pregnant female rats and their off springs. *Res J Pharmaceut Biol Chem Sci* 2015; 6(2):510.
31. Morishige T, Yoshioka Y, Tanabe A, Yao X, Tsunoda SI, Tsutsumi Y, et al. Titanium dioxide induces different levels of IL-1 $\beta$  production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;392(2):160-5.
32. Jonakait GM. The effects of maternal inflammation on neuronal development: possible mechanisms. *Int J Dev Neurosci* 2007; 25(7):415-25.
33. Meyer U, Feldon J, Fatemi SH. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2009;33(7):1061-79.