



## Evaluation of the toxicity effect of titanium dioxide nanoparticles on the brain cortex of the chick embryo during embryonic periods

Riki M<sup>a</sup>, Raji AR<sup>b\*</sup>, Afkhani Goli A<sup>b</sup>, Nourani H<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Ph.D., student of Comparative Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. malihe.riki@gmail.com

<sup>b</sup> Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. rajireza@um.ac.ir, a-afkhani@um.ac.ir

<sup>c</sup> Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. nourani@um.ac.ir

### Original Article

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** Riki M, Raji AR, Afkhani Goli A, Nourani H. Evaluation of the toxicity effect of titanium dioxide nanoparticles on the brain cortex of chick embryo in embryonic periods. Journal of Cell and Tissue. 2025; 16(3):228-244.

doi <https://doi.org/10.61882/JCT.228>

### KEYWORDS

Toxicity,  
Titanium dioxide  
nanoparticles,  
Chicken embryo,  
Brain

### EXTENDED ABSTRACT

**Introduction:** Titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub> NPs) are widely used in industry, medicine, food, and cosmetics. TiO<sub>2</sub> NPs are harmful to the environment and human health. Changes in the environment may especially affect the growing neurological system. Therefore, it is impossible to overlook their impact on the development of the embryo and reproductive success. A sensitive and widely used model for evaluating the teratogenic potential and developmental toxicity of different nanoparticles is the chicken embryo. At the outset of embryogenesis, the application of TiO<sub>2</sub> NPs enables the penetration into various tissues, such as brain precursor cells and structures. Furthermore, the organs are unable to remove the nanoparticles from the egg due to their isolation and enclosure from the mother and the environment. Consequently, the embryos are perpetually exposed to TiO<sub>2</sub> NPs during the 20-day embryogenesis period. In recent years, a growing number of studies have been conducted to examine the possible harmful effects of TiO<sub>2</sub> NPs due to worries about inadvertent exposure of NPs on humans.

**Aim:** In this study, the embryonic toxicity of various dosages of TiO<sub>2</sub> NPs was investigated in the chicken embryo's brain cortex.

\* Corresponding author. Tel: 09153050349

E-mail address: rajireza@um.ac.ir

DOI: <https://doi.org/10.61882/JCT.228>

Received: 22 Oct. 2024; Received in revised form: 23 Jun.2025; Accepted: 10 Jul. 2025

Original Article

© Author



**Materials and Methods:** In this study, 90 fertilized eggs were divided into five groups: control group (untreated group), four treatment groups that received 0 (sham), 12.5, 25, and 50  $\mu\text{g/mL}$  of  $\text{TiO}_2$  nanoparticles. The embryos' morphology, weight, and Crown-rump length (CRL) were assessed after 7, 9, and 13 days. Tissue samples were collected from the cerebrum and cerebellum of the chick embryos. The specimens were immediately fixed in a 10% neutral buffered formalin solution for 48 hours. Subsequently, they were dehydrated through a series of ascending ethanol concentrations (70%, 80%, 90%, and 100%), with each step lasting two hours. The samples were then cleared in xylene for one hour, embedded in paraffin wax, and sectioned at a thickness of  $5\mu\text{m}$  using a microtome. The sections were then mounted on glass slides. Finally, all tissue sections were stained with hematoxylin and eosin, and the effects of  $\text{TiO}_2$  NPs were examined on the histology, pathology, and histomorphometry of the chick embryo cerebrum and cerebellum tissues.

**Results:** The findings showed that  $\text{TiO}_2$  NPs cause embryo death in all days at 25 and 50  $\mu\text{g/mL}$ . In morphological studies, the weight and length of 13-day-old embryos treated with 50  $\mu\text{g/mL}$  of  $\text{TiO}_2$  NPs decreased. Counting of cells (neurons and glial cells) in the cerebral cortex of a 13-day-old chick embryo displayed a significant decrease in the experimental group of 50  $\mu\text{g/ml}$  compared to the control and sham groups. The evaluations showed a decrease in the number of Purkinje cells of the cerebellum cortex in 13-day-old embryos treated with 50  $\mu\text{g/ml}$  of  $\text{TiO}_2$  NPs. The group of 13-day-old embryos treated with 50  $\mu\text{g/ml}$  had a considerable capillary hyperemia in the cerebellar cortex.

**Conclusion:** It was concluded that the in-ovo-administered  $\text{TiO}_2$  NPs given immediately before incubation have adverse effects on the developing cerebellum and cerebrum. So that the increase of damage happened in older embryos, and the highest damage occurred on day 13 of incubation.



## بررسی تاثیر سمیت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر قشر مغز جنین جوجه در دوران جنینی

ملیحه ریکی<sup>۱</sup>، احمدرضا راجی<sup>۲\*</sup>، امیر افخمی گلی<sup>۳</sup>، حسین نورانی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری بافت شناسی مقایسه‌ای، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، malihe.riki@gmail.com

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، rajireza@um.ac.ir

<sup>۳</sup> دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، a-afkhmi@um.ac.ir

<sup>۴</sup> دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، nourani@um.ac.ir

واژگان کلیدی	چکیده
سمیت ننوذرات دی اکسید تیتانیوم جنین جوجه مغز	<p><b>هدف:</b> نانوذرات دی اکسیدتیتانیوم (<math>TiO_2</math>) در صنعت، پزشکی به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شوند. نانوذرات برای محیط زیست و سلامت انسان به‌ویژه بر سیستم عصبی در حال رشد، مضر هستند. در این مطالعه سمیت جنینی غلظت‌های مختلف نانوذرات <math>TiO_2</math> بر بافت قشر مغز جنین جوجه بررسی شد. <b>مواد و روش‌ها:</b> در این مطالعه ۹۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار به پنج گروه دسته بندی شدند: گروه شاهد (بدون تیمار) و چهار گروه درمانی که دوزهای، صفر (شم)، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذرات <math>TiO_2</math> دریافت نمودند. سپس در روزهای ۷، ۹ و ۱۳، بعد از ارزیابی مورفولوژی، وزن و طول، از مخ و مخچه جنین‌ها نمونه بافتی تهیه و ۴۸ ساعت در بافر فرمالین ۱۰ درصد ثابت شد. بعد از مراحل پاساژ بافتی از نمونه‌ها برش تهیه و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شد. سرانجام، مطالعات بافت‌شناسی و آسیب‌شناسی و هستیومورفومتری انجام پذیرفت. <b>نتایج:</b> نانوذرات <math>TiO_2</math> باعث مرگ جنین در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر در تمام روزها می‌شوند. در مطالعات مورفولوژیکی، کاهش وزن و طول جنین‌های ۱۳ روزه تیمار شده با غلظت ۵۰ میکروگرم مشاهده شد. همچنین در بررسی‌های میکروسکوپی، کاهش تعداد سلول‌های قشر مخ و سلوهای پورکنژ قشر مخچه را در جنین‌های ۱۳ روزه تیمار شده با غلظت ۵۰ میکروگرم نشان داد. ارزیابی‌ها، پرخونی در قشر مخچه را نشان داد. <b>نتیجه گیری:</b> تزریق نانوذرات قبل از انکوباسیون اثرات نامطلوبی بر مغز جنین در حال رشد دارد. به‌طوری‌که آسیب‌ها با سن جنینی بیشتر می‌شوند و بالاترین آسیب در روز ۱۳ انکوباسیون اتفاق افتاد.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۰۱	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۴/۰۲	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۱۹	