

## مقاله پژوهشی

## بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سنتز شده به روش زیستی، علیه اشرشیا کلی عامل ایجاد سرطان کولورکتال

حمیده بابائی<sup>۱</sup>، عباس اخوان سپهی<sup>۲\*</sup>، کیومرث امینی<sup>۳</sup> و سارا سعادت‌مند<sup>۴</sup>

۱- رشته میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

۴- گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۴۰۱/۱۰/۱۷، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۴۰۲/۰۱/۲۸، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۴۰۲/۰۲/۲۲

### چکیده

در این مطالعه، اثر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سنتز شده توسط باکتری باسیلوس بر کاهش بیان ژن‌های clbB و clbN باکتری اشرشیا کلی عامل ایجاد سرطان کولورکتال بررسی گردید. سنتز نانوذرات دی اکسید تیتانیوم توسط باکتری باسیلوس تک‌ئولینسیس انجام شد. تشکیل نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با پیک جذب در ۳۵۰ nm بوسیله طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی و XRD نشان داده شد. اندازه و مورفولوژی نانوذرات توسط SEM تعیین شد، بر اساس آنالیز SEM ذرات دارای ساختار کروی با اندازه حدود ۷۸/۱۷-۳۵/۷۶ nm می‌باشند که وجود نانوذرات را تایید می‌کند. آزمون ضدباکتریایی نانوذرات نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و با گذشت زمان از تکثیر باکتری اشرشیا کلی جلوگیری می‌کنند که نشان دهنده رابطه معناداری بین گذشت زمان و کاهش رشد باکتری همراه با افزایش میزان غلظت نانوذرات است. بررسی تاثیر نانوذرات بر روی بیان ژن clb باکتری اشرشیا کلی از روش Real Time PCR در مقایسه با کنترل، کاهش میزان بیان ژن در باکتری بیمار را نشان داد که این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار است. توکسیسیته نانوذرات بر روی رده سلولی HEK293 با روش MTT پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی گردید و نتایج نشان داد که نانوذرات اثر توکسیسیته وابسته به دوز و زمان داشته و میزان آن بطور معنی‌داری بعد از ۷۲ کاهش یافت. بیشترین میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها بعد از ۷۲ ساعت مربوط به غلظت ۱۰۰ µg/ml به میزان ۸۹٪/۹۱ می‌باشد. نانوذرات با اثر بر کاهش رشد و کاهش بیان ژن clb باکتری اشرشیا کلی و سمیت پائینی که روی سلول‌های HEK293 داشت می‌تواند جهت درمان سرطان کولورکتال مورد توجه قرار گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان کولورکتال، دی اکسید تیتانیوم، باسیلوس، ژن clb، اشرشیا کلی.

### ۱- مقدمه

تهدید کننده مرگ و میر مطرح است [۱]. در این میان سرطان کولون یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در مردان و زنان به شمار می‌رود و سالانه باعث مرگ بسیاری از افراد در جهان می‌شود [۲]. سرطان کولورکتال سومین سرطان رایج و

با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در فناوری‌های پزشکی برای تشخیص و درمان سرطان، این بیماری هنوز به عنوان عامل

\* **عده‌دار مکاتبات:** عباس اخوان سپهی

نشانی: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱-۲۲۹۷۱۴۷۴، دورنگار: ۰۲۱-۲۲۹۷۱۴۷۴، پست الکترونیکی: akhavansepahy@gmail.com

فسفریله شده و مقادیر زیاد tyr-15 غیر فعال فسفریله از Cdk1 نمایان می‌شود. همچنین هیستون  $\gamma$ H2AX و چرخه سلول در مرحله G2 متوقف می‌گردد و این اختلال در سیکل سلولی منجر به ایجاد سرطان کولون می‌شود [۵،۶]. امروزه بسیاری از گزینه‌های درمانی سرطان شامل جراحی، شیمی درمانی، پرتو درمانی در دسترس است [۷]. این در حالی است که در بیشتر موارد سلول‌های سالم نیز دچار مرگ می‌شوند و می‌تواند عوارض جانبی در بیمار به همراه داشته باشد. بنابراین نیاز به جستجو در شیوه‌های نوین درمانی برای کنترل سرطان ضروری می‌باشد [۸]. در این میان علم نانوتکنولوژی کمک ارزنده‌ای به پیشرفت در کشف و توسعه راهکارهای نوین درمانی سرطان نموده است [۹]. امروزه فناوری نانو، در درمان و تشخیص سرطان به دلیل عوارض جانبی شدید عوامل شیمی درمانی سنتی به دلیل سمیت سلولی آن‌ها بر روی سلول‌های طبیعی، رواج بیشتری یافته است [۱۰-۱۳]. نانوبیوتکنولوژی یکی از جدیدترین حوزه‌های نوظهور علم است که رابط بین زیست‌شناسی و فناوری نانو، تجزیه، تحلیل و ایجاد نانوساختارهای کاربردی جدید است [۱۴]. چالش‌برانگیزترین تحقیقات فناوری نانو در درمان سرطان، کشف نانوساختارهایی برای تحویل و انتشار داروها به نحوی است که اثر درمانی را افزایش داده و عوارض جانبی را کاهش دهد [۱۵]. تحویل هدفمند دارو و ترشح کنترل شده داروها راهبردهای اصلی نانوساختارهای دی‌اکسید تیتانیوم برای دستیابی به این هدف است. نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به دلیل سازگاری بالا، قابلیت آزادسازی داروها و سمیت پایین به عنوان کاندیدای مناسب به منظور افزایش اثر درمانی بالینی شناخته شده است [۱۶]. روش‌های گوناگونی برای تهیه نانوذرات فلزی وجود دارد مانند احیای شیمیایی، هیدروترمال، میکروامولسیون و استفاده از لیزر [۱۷]، که در میان آن‌ها سنتز نانوذرات فلزی به روش شیمیایی بطور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۸]، این گونه روش‌ها که به نام روش‌های شیمیایی شناخته می‌شوند بسیار پر هزینه بوده و در فرآیند تهیه نانوذرها از مواد شیمیایی مضر، سمی

چهارمین دلیل مرگ و میر در جهان است. این سرطان در ایران پس از سرطان معده، مئانه و پروستات در مردان چهارمین سرطان بوده و در زنان بعد از سرطان سینه دومین سرطان محسوب می‌شود. محققان با بررسی‌های بیشتر نشان دادند افزایش تعداد باکتری‌های اشرشیا کلی واجد ژن pks با آسیب رساندن به DNA سلول‌های پوشش روده سبب ایجاد سرطان کولورکتال می‌گردد. از نظر فیلوژنی اشرشیا کلی به چهار گروه A, B, B2, D تقسیم می‌شوند. برخی از سویه‌های اشرشیا کلی همزیست، از گروه فیلوژنیک B2 حامل یک جزیره بیماری‌زای پلی‌کتاید سنتتاز هستند (PKS) که آنزیم مورد نیاز برای سنتز یک پپتید پلی‌کتاید ژنوتوکسین به نام کلی‌باکترین کد می‌نماید [۳]. آنزیم‌های مورد نیاز جهت سنتز کلی‌باکترین توسط محدوده ژنی با اندازه ۵۴ kb رمز و بیان می‌شود و محل این ژن در لوکوس W ans از tRNA واقع شده است. محدوده ژنومی سنتزکننده کلی‌باکترین از ۳ تا NRPS، ۳ تا PKS، ۲ هیبرید NRPS/PKS و ۹ آنزیم کمکی ویرایشی و برش‌دهنده شامل Clb I, Clb J, Clb K, Clb N, Clb A, Clb B, Clb C, Clb H، Clb D و Clb E تشکیل شده است [۴]. خواص شیمیایی کلی‌باکترین به علت وجود سه آنزیم Clb P و Clb B، Clb N است که در سنتز و طویل شدن و شکست فولدینگ کلی‌باکترین نقش دارند.

در ابتدا Clb N و به همراه Clb B و NRPS/PKS باعث تولید Pre colibactin در فضای سیتوپلاسمی باکتری شده و سپس با عبور از کانال‌ها وارد فضای پری‌پلاسمیک می‌شود و در آنجا توسط Clb P به کلی‌باکترین تبدیل می‌شود. کلی‌باکترین می‌تواند با عبور از غشای خارجی باکتری ترشح شده و روی سلول‌های انتروسیت روده میزبان اثر سایتوتوکسیک گذارد. کلی‌باکترین با فعال شدن مسیر سیگنالینگ باعث آسیب به DNA می‌شود. بدین ترتیب که ابتدا پروتئین (ATM) Ataxia Telangiectasia Mtated را در پاسخ به آسیب DNA فعال می‌کند و باعث فسفریله شدن Cdk2 و سپس فسفریله شدن Cdc25c می‌گردد. در انتها نیز Cdk1 (با ایفای نقش در چک پوینت G2 چرخه تقسیم سلولی میوز)،

نانوذرات با افزایش غلظت در مقابل گونه‌های مختلف باکتری گرم مثبت و گرم منفی با حضور نور ماوراء بنفش افزایش می‌یابد [۲۷]. Ibrahem و همکاران سال ۲۰۱۴ در عراق نانوذرات دی اکسید تیتانیوم را با ابعاد با میانگین ۷۰/۹۸ nm از باکتری لاکتوباسیلوس کریسپاتوس جدا شده از واژن خانم‌های عراقی سنتز کردند و سپس با بررسی خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها در مقابل باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه، اشرشیا کلی و اسیتوباکتر بومانی نشان دادند که بیشترین خاصیت ضدباکتریایی بر علیه باکتری اشرشیا کلی با نتیجه چهار بار مثبت می‌باشد [۲۸]. Malarkodi و همکاران سال ۲۰۱۳ در هندوستان نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با ابعادی مختلف بین ۵۰۰-۱۰۰ nm و به شکل کروی را از گونه باکتریایی کروی شکل، گرم مثبت و فاقد اسپور به نام پلانومیکروبیوم از بستنی سنتز کردند و سپس با بررسی غلظت‌های مختلف نانوذرات در مقابل باکتری‌ها نشان دادند که با افزایش غلظت خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها نیز افزایش می‌یابد [۲۹]. Seo و همکاران در سال ۲۰۰۷ با بررسی دی اکسید تیتانیوم بر روی سلول‌های سرطانی پوست نشان دادند که محلول دی اکسید تیتانیوم در حضور نور ماورا بنفش می‌تواند باعث درمان سلول‌های سرطانی پوست شوند که این هم نشان‌دهنده خاصیت فتوکالیستی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم است [۳۰]. Arthur و همکاران در سال ۲۰۱۲ در آمریکا با مطالعه‌ای که بر روی سویه E.coli NC101 جدا شده از روده به منظور بررسی ارتباط بین جزایر PKS و بیماری‌های التهابی روده و سرطان کولورکتال انجام دادند؛ نشان دادند که در بین ۳۵ نمونه IBD ۲۱ نمونه سرطان کولورکتال و ۲۴ نمونه سالم از لحاظ بیماری‌های التهابی روده و سرطان کولورکتال محدوده‌های ژنومی PKS در حدود ۲۰/۸٪ از نمونه‌های کنترل، ۴۰٪ از نمونه‌های IBD و ۶۶/۷٪ از نمونه‌های سرطان کولورکتال موجود هستند [۳۱]. Johnson و همکاران سال ۲۰۰۸ در فرانسه، ارتباط فیلوژنی و اپیدمیولوژی باکتری اشرشیا کلی حاوی PKS که کدکننده ژنوتوکسین کلی باکتین را بررسی و بیان کرده دو ژن clbB و

و بسیار خطرناکی استفاده می‌شود [۱۹]، که منجر به ایجاد مشکلات زیست‌محیطی می‌شوند [۲۰]. بنابراین محققان به دنبال روش جایگزین و سازگار با محیط‌زیست برای تهیه نانوذره‌های فلزی هستند. در سال‌های اخیر سنتز زیستی توجه بیشتری را نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی به خود اختصاص داده است [۲۱]. بیوسنتز نانوذرات با روش‌های زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها، به دلیل سازگاری بالا با محیط‌زیست و کاهش مصرف انرژی و هزینه‌ها از جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند. در میان روش‌های مختلف بیوسنتز نانوذرات، استفاده از باکتری‌ها از توجه ویژه‌ای برخوردار است [۲۲، ۲۳]. تولید نانوذرات در جنس، گونه و سویه‌های مختلف باکتریایی متغیر است. با مطالعه انواع نانوذرات و یافتن یک ویژگی جالب منحصر بفرد در نانوذره دی اکسید تیتانیوم تحت عنوان خاصیت فتوکاتالیستی باعث شد که امروزه از این ویژگی در تصفیه آب، پاک‌سازی هوا، استرلیزه کردن و ضدعفونی کردن در دنیا استفاده شود [۲۴]. Alavi و همکاران در سال ۲۰۱۸ در ایران با استفاده از باکتری هالوموناس الانگاتا، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم را به شکل کروی و در سایز ۱۰۴/۶۳-۲۷/۷۵ nm به روش زیستی سنتز کردند و سپس خواص ضدباکتریایی آن را مقابل باکتری اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار دادند [۲۵]. Babaei و همکاران در سال ۲۰۱۶ با مطالعه اثر ضد میکروبی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در حضور نور و عدم حضور نور ماوراء بنفش در مقابل باکتری اشرشیا کلی، نشان دادند که جمعیت باکتری اشرشیا کلی بطور قابل توجهی در برابر نانوذرات در حضور نور ماوراء بنفش کاهش می‌یابد که این موضوع اشاره به افزایش خاصیت ضد میکروبی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در حضور نور، به دلیل خاصیت فتوکاتالیستی آن می‌باشد [۲۶]. Duraivaj و همکاران سال ۲۰۱۵ در هندوستان نانوذرات دی اکسید تیتانیوم را در ابعادی با میانگین ۹۰/۲۴ nm و کروی شکل توسط روش زیستی با استفاده از قارچ آسپرژیلوس نایجر سنتز کردند و سپس نشان دادند که فعالیت ضدباکتریایی

## ۲- فعالیت‌های تجربی

الف) نمونه‌برداری از خاک و جداسازی باکتری‌های باسیلوس: جداسازی باکتری‌های مولد نانوذرات دی اکسید تیتانیوم، از نمونه‌های خاک معادن، تیتانیوم کهنوج، سرب قنات مروان، معدن آهن گوهر زمین و معدن مس سرچشمه واقع در استان کرمان انجام شد. به منظور جداسازی باسیلوس‌های موجود در نمونه‌های خاک از دو روش کشت مستقیم و روش تیمار حرارتی استفاده شد. در روش کشت مستقیم، جهت تهیه سوسپانسیون، ۱۰ گرم از هر نمونه خاک در ۹۰ ml محلول نمکی ریخته شد و بعد از ۱۰ دقیقه شیکر در ۱۵۰ rpm از سوسپانسیون ایجاد شده رقت  $10^{-1}$  تا  $10^{-3}$  تهیه و از کلیه رقت‌های مورد نظر، کشت سطحی در محیط کشت تریپتیک سوی آگار (مرک آلمان) استریل انجام شد و پس از گرمخانه‌گذاری در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  پس از ۲ ساعت از لحاظ رشد و عدم رشد بررسی شدند. در روش تیمار حرارتی مانند روش مستقیم عمل نموده البته در این روش بعد از تهیه سوسپانسیون اولیه از خاک، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شد [۳۳].

ب) سنتز نانوذرات دی اکسید تیتانیوم توسط جدایه باسیلوس: پس از رشد و اطمینان از خلوص کلنی‌های باسیلوس، تلقیح کلنی‌ها به محیط کشت نوترینت برات (مرک آلمان) انجام و به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  و در دور 150 rpm گرمخانه‌گذاری شدند. در ادامه کلیه محیط‌های مایع، در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و به محلول رویی  $0.025\text{ mol/l}$  تیتانیوم هیدروکسید افزوده شد و به مدت ۱ ساعت روی شیکر قرار گرفت و در ادامه محلول در  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری قرار داده شد و در صورت ایجاد رسوب سفید رنگ، توسط سانتریفیوژ جداسازی و ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد و از رسوب حاصله بعد از خشک شدن جهت تایید نانوذرات  $\text{TiO}_2$  تحت آنالیزهای دستگاهی Ultraviolet spectroscopy (مدل دستگاه UV-160A) ساخت شرکت ژاپن Shimadzu، X-ray diffraction (مدل

clbN با سویه‌های متعلق به گروه فیلوژنی Extrain Testinal Pathogenic Escherichia coli ارتباط دارد و ۴۴ مورد از ۵۸ سویه برای این ژن مثبت بودند [۳۲]. در سال‌های اخیر با توجه به شیوع فراوان سرطان‌ها از جمله سرطان کولورکتال در انسان باید به دنبال روشی باشیم که به صورت طبیعی و با اثر بخشی بر روی ژن‌های سرطان‌زایی میکروارگانسیم‌های عامل ایجاد سرطان از جمله اشرشیا کلی واجد ژن clb موجود در دستگاه گوارش انسان این مشکلات را بر طرف نمائیم. تولید نانوذرات تیتانیوم با استفاده از میکروارگانسیم‌ها از نظر هزینه، مصرف انرژی و ایمنی، نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی برتری دارد. از سوی دیگر تولید نانوذرات در جنس، گونه و سویه‌های مختلف باکتریایی متغیر است. باسیلوس‌ها باکتری هوازی، تحمل‌کننده اکسیژن و دارای اسپور است که می‌تواند حتی در شرایط سخت و نامطلوب زنده بماند که این خاصیت آن‌ها را به عنوان یک کاندیدای مناسب برای بیوسنتز نانوذرات فلزی مانند  $\text{TiO}_2$  ساخته است. از قابلیت‌های مهم باکتری انتخاب شده سنتز نانوذرات فلزی و یا اکسید آن‌ها است. اکنون می‌توان با استفاده از روش‌های بهینه که در آن میکروارگانسیم‌های موجود در خاک مثل باکتری باسیلوس و تولید نانوذرات دی اکسید تیتانیوم از آن‌ها و اثر بخشی این نانوذرات بر روی باکتری اشرشیا کلی مولد ژن‌های clbB و clbN باعث مهار بیان این ژن‌ها شده تا مانع عوامل عفونی دخیل در سرطان کولورکتال در انسان شود. در این مقاله برای اولین بار سنتز زیستی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم توسط باکتری باسیلوس تکونیلنسیس جدا شده از خاک معدن فلزی استان کرمان انجام شد و سپس تاثیر این نانوذرات بر میزان رشد و بیان clb باکتری اشرشیا کلی عامل ایجاد سرطان کولورکتال توسط روش Real Time PCR بررسی گردید و در نهایت برای اطمینان از بی‌خطر بودن این نانوذرات در آینده جهت مصارف پزشکی و خوراکی اثر سمیت این نانوذرات بر روی رده سلول‌های نرمال HEK293 توسط آزمون MTT مورد مطالعه قرار گرفت.

Duplex PCR استفاده شد. جهت استخراج DNA باکتری اشرشیا کلی از کیت استخراج DNA باکتری گرم منفی شرکت سینا ژن استفاده شد و برای ژن clbB از پرایمر فوروارد 5'-GCGCATCCTCAAGAGTAAATA-3' و پرایمر ریورس 5'-GCGCTCTAGTGCTCACAAACC-3' و همچنین برای ژن clb N از پرایمر فوروارد 5'-TCGATATAGTCACGCCACCA-3' و پرایمر ریورس 5'-GTCAAGCGAGCATACGAACA-3' تولید شده توسط شرکت تکاپو زیست استفاده شد.

جهت انجام PCR مواد مورد استفاده شامل ۱ μl از هر پرایمر فوروارد و ریورس ژن های clbB و clbN، ۴ μl از DNA الگو، ۱۰ μl Master mix 2X و با آب مقطر به حجم نهایی ۲۰ μl رسانده شد. واکنش طبق برنامه در یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ °C به مدت ۳۰ دقیقه، ۳۵ سیکل در دمای ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به ترتیب به مدت ۶۰ ثانیه و ۱۰ دقیقه انجام شد [۳۷-۳۹].

ه) بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر علیه باکتری در حضور و عدم حضور نور ماوراءبنفش: با توجه به خاصیت فتوکاتالیستی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم به بررسی خاصیت ضدباکتریایی این نانوذرات در حضور و عدم حضور نور ماوراءبنفش پرداخته شد. در ابتدا غلظت های ۱٪ و ۲٪ از نانوذرات سنتز شده تهیه شد و پس از اتوکلاو شدن مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت مایع لوریل سولفات برات (مرک آلمان) در ارلن های ۵۰ ml حاوی ۲۰ ml از محیط کشت ریخته شد و ۱۰۰ μl از نمونه باکتریایی اشرشیا کلی (رقت ۰/۵ مک فارلند معادل ۱/۵ × ۱۰<sup>۸</sup> باکتری در هر میلی لیتر) اضافه و ۴ نوع ارلن ۵۰ ml تهیه گردید، ارلن شاهد که بدون اثر UV و بدون نانوذرات دی اکسید تیتانیوم، ارلن دوم بدون نانوذرات و با اثر UV، ارلن سوم با اثر UV و ۱ ml سوسپانسیون ۱٪ نانوذرات، ارلن چهارم با اثر UV و ۱ ml از سوسپانسیون ۲٪ نانوذرات بود. تمام مراحل آزمایش در تاریکی و بدون حضور نور مرئی و با ۳ مرتبه تکرار انجام شد

(Philips شرکت PW1730، Fourier Transform Infrared Spectroscopy به اختصار FTIR (مدل دستگاه AVATAR ساخت شرکت Thermo آمریکا)، Scanning Electron Microscopy به اختصار SEM (مدل دستگاه FEI Quanta 200 ESEM ساخت کشور آمریکا) قرار گرفت [۳۴،۳۵].

ج) شناسایی مولکولی باکتری مولد نانوذرات دی اکسید تیتانیوم: در ابتدا استخراج DNA ژنومی از باکتری مورد نظر طبق پروتکل کیت استخراج DNA باکتری گرم مثبت شرکت سیناژن صورت گرفت. در این مطالعه از پرایمر فوروارد 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' و پرایمر ریورس 5'-ACGGGCGGTGTGTACAA-3' تولید شده مطابق با منبع مورد نظر توسط شرکت تکاپو زیست استفاده شد. مواد مورد استفاده جهت انجام PCR شامل ۱ μl از هر پرایمر فوروارد و ریورس، ۴ μl از DNA الگو، ۱۰ μl مستر میکس 2X و با آب مقطر به حجم نهایی ۲۰ μl رسانده شد. واکنش طبق برنامه در یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ °C به مدت ۳۰ دقیقه، ۳۵ سیکل در دمای ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به ترتیب به مدت ۶۰ ثانیه و ۱۰ دقیقه انجام شد. برای تایید تکثیر DNA، محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد جریان یافت (مارکر استفاده شده ۱۰۰ bp بود که از شرکت سیناکلون تهیه شد) و پس از اطمینان از حضور باند ۱۰۰۰ bp محصول PCR توسط شرکت تکاپو زیست تعیین توالی شد. همانندی توالی نوکلئوتیدهای ژن 16SrRNA به کمک نرم افزار BLAST با توالی های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی ژنوم بانک ژنی مقایسه شد و سپس با استفاده از نرم افزار MEGA-7 درخت فیلوژنی مربوطه ترسیم شد [۳۶].

د) جداسازی باکتری های اشرشیا کلی واجد ژن clbB و clbN: تعداد ۱۲ نمونه باکتری اشرشیا کلی عامل ایجاد کننده سرطان از دانشگاه تولوس فرانسه توسط مرکز تحقیقاتی پاسارگاد تهیه شد و جهت انجام آزمایش به آزمایشگاه انتقال یافت. در ابتدا برای حضور هر دو ژن clbB و clbN، از روش

انجام شد که با توجه به آن MIC مشخص شد و چاهک قبلی به عنوان Sub MIC باکتری تیمار شده با نانوذره دی اکسید تیتانیوم در نظر گرفته شد و سپس به همراه باکتری شاهد برای واکنش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

ز) واکنش Real Time PCR: استخراج RNA باکتری اشرشیا کلی با استفاده از کیت استخراج RNA باکتری شرکت سیناژن، انجام شد و پس از اطمینان از کیفیت RNA با انجام الکتروفورز ژل آگارز از RNA توسط آنزیم ترانس کریپتاز نسخه برداری معکوس انجام شد. سپس از cDNA تولید شده به عنوان الگو در واکنش زنجیره ای پلیمرز جهت تکثیر قطعه مورد نظر استفاده گردید و در نهایت ژل ها با تکنیک الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت انجام واکنش Real Time PCR برای cDNA باکتری اشرشیا کلی واجد ژن clb و باکتری شاهد، مواد مورد استفاده شامل ۱ μl از هر پرایمر فوروارد و ریورس (پرایمر فوروارد برای ژن  $5' \text{-GGTGAATACGTTCCCGG}_3'$  و پرایمر ریورس  $3' \text{-TACGGCTACCTTGTTACGATT}_5'$  و برای ژن clb  $5' \text{-AAGCCGTATCCTGCTCAAAA}_3'$  و پرایمر ریورس  $3' \text{-GCTTCTTTGAGCGTCCACAT}_5'$  استفاده شد)، ۱ μl از cDNA، ۱۰ μl Syber green master mix 2x و حجم نهایی با آب مقطر به ۲۰ μl رسانیده شد. واکنش طبق برنامه در یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل در دمای ۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۶ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه، ۹۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه و ۶۰ °C به مدت ۱ دقیقه انجام شد. بعد از تهیه ترکیبات مورد نظر در دستگاه Real Time PCR قرار داده شد و بعد از پایان واکنش، بیان ژن ها مورد بررسی قرار گرفت [۴۳،۴۴].

ح) آزمون سنجش سمیت دی اکسید تیتانیوم بر سلول ها به روش MTT: به منظور بررسی اثر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سنتز شده توسط باکتری باسیلوس، بر روی رشد و تکثیر سلول های نرمال از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. این روش یک تست متابولیک رقابتی میتوکندریایی

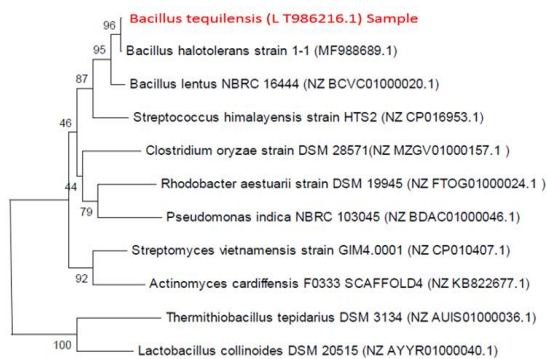
و برای جلوگیری از تاثیر UV، نمونه های شاهد با استفاده از فویل آلومینیوم پوشانده شد. سپس ارلن ها را بروی شیکر با دور ۲۵ rpm و در زیر هود با فاصله ۸ cm مقابل لامپ LED UVA با طول موج ۳۶۵ nm قرار داده و پس از گذشت هر یک از زمان های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه، ۱ ml از هر نمونه، بر روی محیط کشت جامد و یولت رد بایل آگار (مرک آلمان) به صورت پورپلیت کشت داده شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ °C تعداد کلنی های تشکیل شده (CFU) توسط دستگاه کلنی کانترا مدل TAT-KO ساخت شرکت طیف آزما طب مورد شمارش قرار گرفت. در نهایت داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS ver 23 پردازش شد و نمودار نیز توسط نرم افزار Excel ترسیم گردید [-۴۰].

و) تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) باکتری اشرشیا کلی واجد ژن clb: جهت بررسی بیان ژن های clbB و clbN باکتری اشرشیا کلی، نمونه باکتریایی تیمار شده (که تحت تاثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و نور UV قرار گرفته) و نمونه باکتریایی غیر تیمار (نمونه شاهد) مورد آزمایش قرار گرفت. جهت تعیین MIC، باکتری اشرشیا کلی تحت تاثیر غلظت های متفاوت از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و در حضور نور مرئی فرابنفش قرار گرفت. بدین منظور از میکروپلیت های ۹۶ خانه ای و محیط کشت مولر هینتون برات استفاده شد و به هر یک از چاهک های میکروپلیت های ۱۰۰ μl محیط کشت مولر هینتون برات و ۱۰۰ μl از سوسپانسیون نانوذرات با غلظت اولیه ۱۰۲۴ ml/μg به اولین چاهک اضافه شد و سپس تا ۱۲ چاهک رقت سازی متوالی به ترتیب انجام شد. سپس به هر چاهک ۱۰۰ μl سوسپانسیون باکتری ۰/۵ مک فارلند ( $10^8 \times 1/5$  باکتری در هر میلی لیتر) اضافه شد. جهت کنترل کیفی نمونه ها برای آزمون، کنترل مثبت (محیط کشت حاوی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم) و کنترل منفی (محیط کشت حاوی سوسپانسیون باکتری و فاقد نانوذره) در نظر گرفته شد پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور شیکردار (۳۷ °C و ۱۰۰ rpm) کدورت سنجی

$$\text{میانگین جذب در تیمار مورد نظر} \times 100 - \text{درصد سمیت سلولی} \\ \text{میانگین جذب در تیمار کنترل} \quad (۲)$$

### ۳- نتایج و بحث

الف) نتایج حاصل از جداسازی باسیلوس‌های سنتز کننده نانوذرات دی اکسید تیتانیوم: از بین ۴۵ کلنی جداسازی و خالص شده از روش کشت مستقیم و تیمار حرارتی، که برای تولید نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بکار گرفته شده بودند ۵ جدایه باکتری باسیلوس گزارش شد که تنها ۱ جدایه رسوب سفید رنگ بیشتری نسبت به سایر جدایه‌ها ایجاد کرد و پس از مقایسه توالی ۱۶ SrRNA باکتری جدا شده با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی با استفاده از نرم‌افزار Blast، باکتری مورد نظر، باسیلوس تکوئیلنسیس شناسایی شد. با توجه به شکل ۱، درخت فیلوژنی نشان دهنده ارتباط بین توالی‌های ۱۶SrRNA ایزوله‌های مورد مطالعه و توالی‌های مرجع در GenBank می‌باشد. اعداد واقع در گره کلادها نمایانگر ارزش Bootstrap (%) می‌باشد. از باکتری *Bacillus tequilensis* (LT986216) به عنوان outgroup استفاده شد.



شکل ۱: درخت فیلوژنی، نشان دهنده ارتباط بین توالی ژن *SrRNA16* باکتری باسیلوس تکوئیلنسیس سویه LT986216 با دیگر باکتری‌ها را نشان می‌دهد. اعداد واقع در گره کلادها نمایانگر ارزش (bootstrap 100%) است.

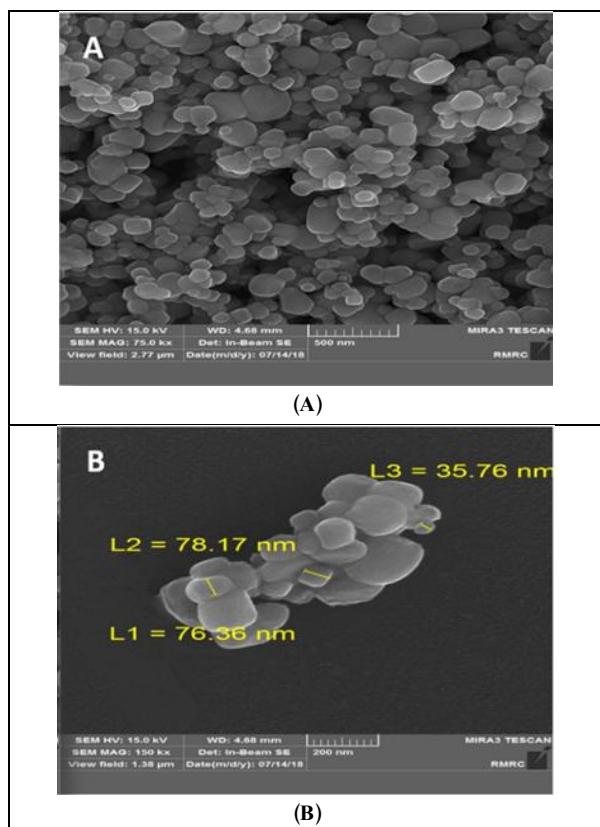
ب) نتایج حاصل از طیف سنجی فرابنفش نانوذرات دی اکسید تیتانیوم: در محدوده ۲۰۰ تا ۵۵۰ nm، وجود بالاترین

است و بر اساس شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز سلول‌های زنده استوار است. برای انجام این آزمایش، از میکروپلیت‌های کشت سلولی ۹۶ خانه‌ای استفاده می‌شود. بعد از کشت سلول‌های کلیه جنین انسان (Human embryonic kidney cells 293) در فلاسک‌های کشت سلولی، حجم ۱۰۰ µl محیط کشت حاوی سلول‌ها با تراکم ۲۰۰۰۰ عدد در هر چاهک قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، در معرض غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰ و ۵۰ µg/ml نانوذرات دی اکسید تیتانیوم قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، به هر چاهک ۱۰۰ µl رنگ MTT (۳،۵،۴) دی متیل تیازولیل (۲-۵،۲) دی فنیل تترازولیوم بروماید (Sigma-Aldrich MTT) با غلظت ۰/۵ mg/ml به هر چاهک افزوده شد و پلیت به مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ °C، مجهز به CO<sub>2</sub> انکوبه شده و سپس مایع رویی هر چاهک خارج و ۱۰۰ µl دی متیل سولفو کساید (DMSO) یا ایزوپروپانول جهت حل نمودن کریستال‌های فرمازان ارغوانی رنگ به هر چاهک اضافه شد. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق بر روی شیکر قرار داده شد. سپس جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ nm در مقابل بلانک خالی DMSO قرائت گردید. برای هر غلظت ۴ چاهک و تمام مراحل نیز ۲ بار تکرار گردید. در نهایت، درصد سلول‌های زنده یا میزان بقای سلولی بر اساس رابطه ۱ و میزان توکسیسیتی ایجاد شده با استفاده از رابطه ۲ که در ذیل نوشته شده محاسبه شد [۴۵]. نتایج با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS Ver 23 بررسی و  $P < 0/05$  معنادار در نظر گرفته شد و پس از مشخص شدن اختلاف و تفاوت معنی‌داری در سطوح مختلف از طریق آزمون Duncan در هر دو زمان مشخص سطوح معنی‌داری تعیین گردید.

درصد سمیت سلولی -100 = درصد زنده‌مانی

(۱)

شکل ۳ که مربوط به بزرگنمایی ۵۰۰ nm از نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی است شکل کروی نانوذرات کاملاً مشخص می‌باشد و در تصویر B با بزرگنمایی ۲۰۰ nm، نانوذرات قطری بین ۷۸/۱۷-۳۵/۷۶ nm دارند که تاییدی بر ساختار نانوذرات دی اکسید تیتانیوم می‌باشد (شکل ۳).

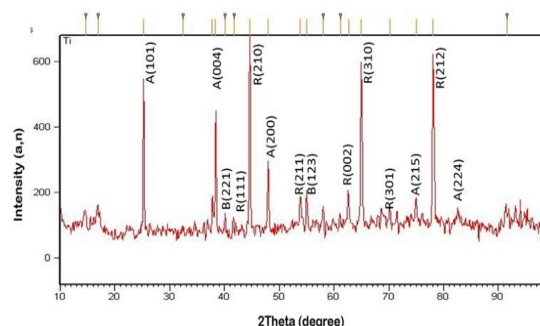


شکل ۳: تصویر (A) تصویر میکروسکوپ الکترونی گرفته شده از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سنتز شده توسط باکتری باسیلوس تکوین‌نیس با بزرگنمایی ۵۰۰ nm، تصویر (B) تصویر میکروسکوپ الکترونی گرفته شده از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سنتز شده توسط باکتری باسیلوس تکوین‌نیس با بزرگنمایی ۲۰۰ nm.

(و) طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS): برای آنالیز عنصری ذرات، بطور تصادفی دو ذره از نمونه انتخاب و با EDS آنالیز شدند. شکل شماره ۴ نتایج آزمون EDS از این دو نقطه را نشان می‌دهد. در هر دو الگوی انرژی پرتو ایکس، اکسیژن و تیتانیوم شناسایی شدند. میزان تیتانیوم در این دو ذره، نزدیک به ۶/۷۲ درصد وزنی است.

پیک جذب در طول موج ۳۵۰ nm با دستگاه طیف‌سنجی UV-Vis گزارش شد که نشان دهنده سنتز زیستی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم می‌باشد.

(ج) آنالیز پراش اشعه ایکس تشکیل کریستال‌های نانوذرات دی اکسید تیتانیوم را در نمونه تایید نمود. مطابق شکل ۲ پیک‌هایی قوی و مجزا در زوایای ۲، ۲۵، ۳۹، ۴۰، ۴۲، ۴۵، ۴۸، ۵۵، ۵۸، ۶۳، ۶۵، ۷۰، ۷۵، ۷۸ و ۸۳ درجه دیده شد که به ترتیب با سطوح ۱۰۱، ۰۰۴، ۲۱۱، ۲۲۱، ۱۱۱، ۲۱۰، ۲۰۰، ۲۱۱، ۱۲۳، ۰۰۲، ۳۱۰، ۳۰۱، ۲۱۵، ۲۱۲ و ۲۲۴ دی اکسید تیتانیوم هم‌خوانی داشت. هیچ‌گونه پیک از ناخالصی در الگوی پراش اشعه X مشاهده نشد. بنابراین محصول مربوطه با خلوص بالا تهیه شده است.



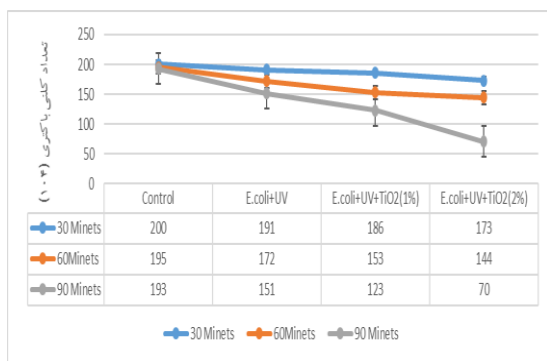
شکل ۴: الگوی پیک‌های حاصل از طیف پراش اشعه ایکس نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (ساختارهای بلوری نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بصورت A) آناتاز، B) بروکیت و R) روتایل مشخص گردید.

(د) نتایج حاصل از آنالیز طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم نشان داد که پیک‌های جذبی در ناحیه  $3600-3200\text{ cm}^{-1}$  مربوط به شیوه‌های ارتعاشی کششی مقارن O-H، در ناحیه  $2900-2800\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات کششی C-H و در ناحیه  $1670\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش خمشی O-H می‌باشد. در نمونه اکسید فلزی تیتانیوم پیکی در ناحیه  $683\text{ cm}^{-1}$  دیده شد که بر شیوه‌های ارتعاشی کششی فلز اکسیژن تعلق دارد.

(ه) نتایج حاصل از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی SEM نانوذرات دی اکسید تیتانیوم: با توجه به تصویر A در



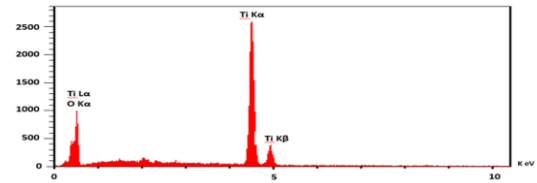
توجه به فاصله‌ای بودن متغیرها استفاده گردید. لذا با وجود  $p \leq 0.05$  و عدد ضریب همبستگی یک (نشان‌دهنده رابطه همبستگی قوی) فرض ما اثبات گردید و با توجه به رابطه معناداری بین گذشت زمان و کاهش رشد باکتری نسبت به کنترل در محدوده زمانی ۳۰ و ۶۰ دقیقه، ۳۰ و ۹۰ دقیقه و در محدوده زمان‌های ۶۰ و ۹۰ دقیقه وجود داشت و با توجه به اینکه  $p \leq 0.5$  می‌باشد نشان‌دهنده این امر است که با گذشت زمان تعداد کلنی‌های باکتریایی کاهش یافته و رابطه معناداری بین گذشت زمان و کاهش رشد باکتری همراه با افزایش میزان غلظت نانوذره وجود دارد.



شکل ۶: تعداد کلنی باکتری اشرشیا کلی در غلظت‌های متفاوت از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در حضور نور ماوراءبنفش در زمان‌های مختلف.

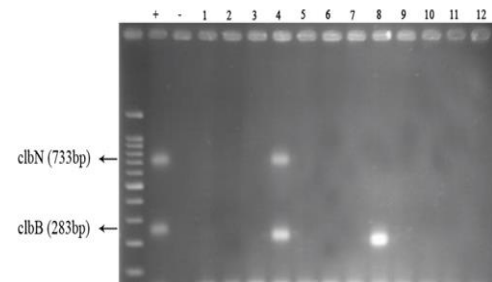
ط) نتایج حاصل از MIC: با توجه به کدورت‌سنجی، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) نانوذرات دی اکسید تیتانیوم برای باکتری اشرشیا کلی واجد ژن clbB و clbN 256  $\mu\text{g/ml}$  (Sub MIC) ۱۲۸  $\mu\text{g/ml}$  گزارش شد. بنابراین غلظت ۱۲۸  $\mu\text{g/ml}$  به عنوان باکتری تیمار شده توسط نانوذرات دی اکسید تیتانیوم جهت بررسی میزان بیان ژن بوسیله واکنش مولکولی Real Time PCR استفاده شد.

ی) نتایج حاصل از بررسی بیان ژن clb باکتری اشرشیا کلی تحت تاثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم توسط روش مولکولی Real Time PCR نشان داد بیان ژن clb تیمار شده با نانوذرات در مقایسه با کنترل کاهش یافته است. با توجه به نمودار (شکل ۷)، در مقایسه نمودار تکثیر ژن clb و ۱۶SrRNA به عنوان Housekeeping قبل و بعد از مواجهه با



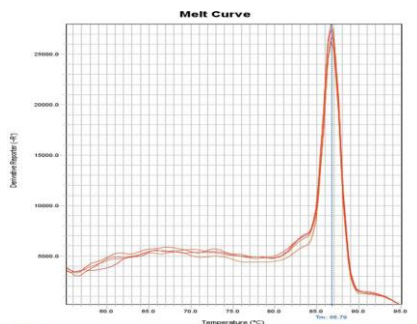
شکل ۴: نتایج آزمون طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس نانوذرات تولید شده توسط باکتری باسیلوس تکونیلنسیس.

ز) نتایج حاصل از شناسایی ژن‌های clbB و clbN در جدایه‌های E.coli توسط واکنش مولکولی Duplex PCR: با توجه به شکل ۵، از تعداد ۱۲ باکتری اشرشیا کلی تهیه شده ۱ جدایه باکتریایی واجد هر دو ژن clbB و clbN بود. جدایه شماره ۴ برای بررسی‌های بعدی در نظر گرفته شد.



شکل ۵: فراوانی ژن‌های clbB و clbN در سویه‌های اشرشیا کلی، از سمت چپ به ترتیب ستون: M مارکر و ستون +: کنترل مثبت و ستون -: کنترل منفی و ستون‌های ۱ تا ۱۲ جدایه‌های اشرشیا کلی می‌باشد.

ح) نتایج حاصل از بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر علیه باکتری اشرشیا کلی واجد ژن clb در حضور و عدم حضور نور ماوراء بنفش: با توجه به نمودار (شکل ۶)، گذشت زمان و حضور نور ماوراءبنفش اثر قابل توجهی بر کاهش تعداد کلنی‌های باکتری نسبت به کنترل داشته که بیان‌کننده خاصیت فتوکاتالیتیکی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در برابر نور ماوراءبنفش می‌باشد. علاوه بر این با افزایش غلظت نانوذرات تعداد کلنی‌ها کاهش یافت که موضوع خاصیت ضد میکروبی نانوذرات را مشخص می‌کند و با آنالیز توسط نرم‌افزار SPSS ver 22 جهت بررسی وجود رابطه معناداری بین گذشت زمان و کاهش رشد باکتری با اضافه کردن نور فرابنفش و نانوذره دی اکسید تیتانیوم ۱ و ۲ درصد به محیط کشت از روش ضریب همبستگی پیرسون با



شکل ۹: منحنی ذوب ژن clb در سویه باسیلوس تکوئیلنسیس تیمار شده با نانوذره دی اکسید تیتانیوم نشان داد که منحنی‌های ژن مورد سنجش در تمام نمونه‌ها باهم منطبق و بصورت تک قله‌ای هستند.

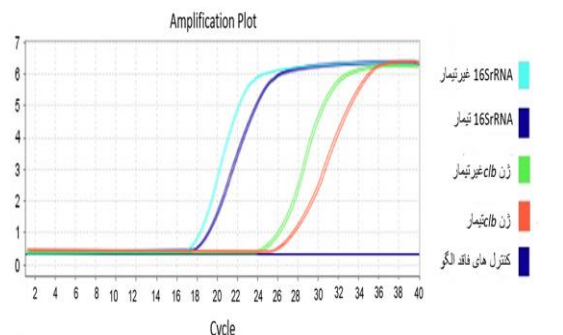
جدول ۱: نتایج  $\Delta Ct$  ژن clb در مواجهه با نانوذره دی اکسید تیتانیوم.

۲- $\Delta Ct$ نمونه کنترل	۲- $\Delta Ct$ تیمار	۲- $\Delta Ct$ نمونه کنترل	۲- $\Delta Ct$ تیمار	$\Delta Ct$ نمونه کنترل	$\Delta Ct$ تیمار
۱	۰/۷۹	۰	۰/۳۳	۷/۳۲	۷/۶۴

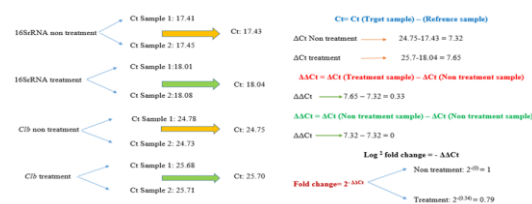
که هیچ تاثیری بر روی بیان ژن ۱۶SrRNA نداشته است. (ک) نتایج حاصل از آزمون سنجش سمیت دی اکسید تیتانیوم بر سلول‌ها:

با توجه به نمودار (شکل ۱۰)، میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها بعد از گذشت ۴۸ ساعت حداقل بود، اما بعد از ۷۲ ساعت میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها افزایش یافت. کمترین میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها به ترتیب بعد از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت مربوط به غلظت ۰/۱، ۰/۱۳/۵۴ و ۰/۶۳/۴۳  $\mu\text{g/ml}$ ، بیشترین میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها به ترتیب بعد از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت مربوط به غلظت ۵ و ۱۰۰ و ۸۹/۹۱  $\mu\text{g/ml}$  بود. تحلیل آماری توسط نرم‌افزار SPSS ver 23 و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای Duncan و Paired T-Test بررسی شد. در آنالیز واریانس (ANOVA) جهت بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌های هر دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت بصورت جداگانه بررسی شد که مقدار  $\text{sig} = 0$  یا  $\text{Pvalue} = 0$  در هر دو زمان را نشان داد. بنابراین با توجه به معنی‌دار بودن  $\text{p} \leq 0.05$  نتیجه حاصل از آنالیز معنی‌دار بودن اختلاف بین سطوح تیمار و تاثیرگذاری آن را بر روی زنده‌مانی سلول را مشخص نمود.

نانوذرات مشخص شد که میزان  $\Delta Ct$  افزایش یافته است.  $\Delta Ct$  ژن ۱۶SrRNA در قبل و بعد از تیمار به ترتیب ۱۷/۴۳ و ۱۸/۰۴ بدست آمد. با توجه به اینکه اختلاف  $\Delta Ct$  قبل و بعد از تیمار با نانوذره دی اکسید تیتانیوم تنها ۰/۶۱ اختلاف دارد و این اختلاف ناچیز بوده بنابراین از ژن ۱۶SrRNA به عنوان ژن خانگی و استاندارد داخلی استفاده شده است.  $\Delta Ct$  ژن clb در مواجهه با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم طبق شکل ۸ محاسبه گردید و نتایج در جدول ۱ آورده شد. با توجه به شکل ۹ پیک اصلی در منحنی ذوب ژن clb در سویه باسیلوس تکوئیلنسیس تیمار شده با نانوذرات دمای  $^{\circ}\text{C}$  ۸۶/۷۹ را نشان داد.



شکل ۷: نمودار تکثیر ژن clb در قبل و بعد از تیمار با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و نمودار پیشرفت واکنش ژن ۱۶SrRNA به عنوان ژن Housekeeping به همراه  $\Delta Ct$  محاسبه شده.

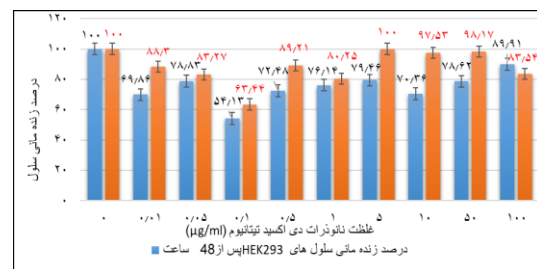


شکل ۸: نتایج حاصل از بررسی بیان ژن clb با کتری اشرشیا کلی تحت تاثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم توسط روش مولکولی Real Time PCR.

برای تعیین میزان بیان ژن clb از روش PFAFFL استفاده شد. در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر ۱۰۰ درصد و از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  به منظور بررسی بیان ژن استفاده شد. با توجه به جدول ۲ نانوذرات دی اکسید تیتانیوم باعث کاهش بیان ژن clb شده است، در حالی

باکتری اشرشیا کلی نشان دادند که کاهش ۲ تا ۳ سیکل لگاریتمی کلنی‌های باکتریایی تنها با همبستگی بین غلظت‌های بالای نانوذرات، وجود نور و گذشت زمان امکان‌پذیر خواهد بود و این نتیجه در مورد هر دو نوع مختلف نانوذره دی اکسید تیتانیوم صادق بود و آنالیز داده‌ها رابطه معنی‌دار بودن ( $p < 0/05$ ) را نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد [۴۶]. Jaderi و همکاران سال ۲۰۱۲ با بررسی اثر غلظت‌های ۱٪ و ۲٪ نانو ذرات تیتانیوم دی اکساید بر روی باکتری اشرشیا کلی با گذشت زمان ۳۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه و با حضور و عدم حضور نور UV نشان دادند که با افزایش غلظت نانوذرات، جمعیت میکروبی باکتری اشرشیا کلی کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد پیدا نموده است. هرچند غلظت تیتانیوم دی اکساید به تنهایی نمی‌تواند ملاک بررسی قرار گیرد و میزان پرتودهی توسط UV به صورت توأمان سبب کشندگی میکرواورگانیزم‌ها می‌گردد. اما تأثیر غلظت به تنهایی معرف افزایش کشندگی با افزایش غلظت است. در غلظت ۱٪ نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر باکتری اشرشیا کلی 104 cfu نسبت به نمونه شاهد  $4 \times 10^4$  را نشان دادند کاهش قابل ملاحظه‌ای دارد و در این غلظت دی اکسید تیتانیوم توانسته است ۲ سیکل لگاریتمی بار میکروبی را کاهش دهد ( $p < 0/05$ ) در غلظت ۲ درصد از نانوذره دی اکسید تیتانیوم نتیجه مشابهی دیده شد. جمعیت میکروبی از  $4 \times 10^4$  به  $1 \times 10^4$  کاهش پیدا کرد که نشان دهنده آن است که دی اکسید تیتانیوم در این غلظت‌ها توانست جمعیت میکروبی را حدود ۲ سیکل لگاریتمی کاهش دهد [۴۰]. اثر قاطع نبودکنندگی نانوذرات تیتانیوم اکساید توسط دیگر محققین نیز تایید شده است و علاوه بر آن نتایج حاصل از مطالعه حاضر با بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر علیه باکتری اشرشیا کلی واجد ژن clb در حضور و عدم حضور نور ماوراءبنفش با غلظت‌های ۱٪ و ۲٪ در سه زمان ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه نشان داد گذشت زمان و حضور نور ماوراءبنفش اثر قابل توجهی بر کاهش تعداد کلنی‌های باکتری اشرشیا کلی نسبت به نمونه کنترل داشته در نتیجه

سپس اختلاف و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط آزمون Duncan انجام شد و در نهایت با آزمون paired t-Test مقایسه میانگین جذب نوری در تیمارهای هر دو گروه مقدار  $\text{sig}=0$  را نشان داد. لذا با توجه به  $P \leq 0.05$  در می‌بایم اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف تیمار با گذشت زمان و تاثیر گذاری آن‌ها بر روی زنده‌مانی سلول وجود دارد.



شکل ۱۰: مقایسه درصد توانایی زنده‌مانی سلول‌های HEK293 در مقابل غلظت‌های متفاوتی از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بعد از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت.

یکی از ویژگی‌های خاص نانوذرات دی اکسید تیتانیوم که باعث تمایز آن نسبت به دیگر نانوذرات فلزی شده اثرات فتوکاتالیتی قوی آن می‌باشد که اثرات ضد میکروبی آن را افزایش می‌دهد. از سه دهه گذشته تاکنون دی اکسید تیتانیوم به دلیل خواص متعدد بیولوژیکی، فیزیکی فتوکاتالیتی، ضد میکروبی، ضدسرطانی، سمیت پایین و عدم واکنش آلرژیک یا درماتیت تماسی مورد توجه محققین علوم مختلف بهداشتی و صنعتی قرار گرفته است. خواص دی اکسید تیتانیوم وابسته به اندازه ذرات و روش سنتز آن و در نهایت ساختار بلوری ایجاد شده است. Ripolles و همکاران سال ۲۰۱۹ با بررسی اثر غلظت‌های متفاوتی از دو نوع مختلف نانوذره دی اکسید تیتانیوم به نام‌های NM101 (شکل کریستال آناتاز نانوذره با اندازه ۷ nm) و NM105 (شکل کریستالی آناتاز-روتایل نانوذره با اندازه ۲۱ nm) با حضور و عدم حضور نور UV با طول موج ۳۱۵-۴۰۰ nm در زمان‌های ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۲ دقیقه و به مدت ۲۴ ساعت بر روی گروهی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از جمله

می باشد که آن‌ها از روش شیمیایی ولی در مطالعه حاضر از روش زیستی سنتز شده است. اما در مطالعه کنونی نتایج XRD و SEM نشان داد که نانوذرات کروی و قطری بین ۷۸/۱۷-۳۵/۷۶ نانومتر دارد که تاییدی بر ساختار نانوذرات دی اکسید تیتانیوم می باشد. و نانوذرات با داشتن نسبت سطح به حجم بالا خاصیت ضد میکروبی خوبی از خود نشان می دهند. بنابراین نتیجه بررسی خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در این تحقیق با نتایج محقق مذکور هم خوانی دارد. Shokrolahi و همکاران در سال ۲۰۱۸ با بررسی اثر سمیت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر روی رده سلولی سرطان کلون HT29 در غلظت‌های مختلف نانوذرات توسط روش MTT نشان دادند که نانوذرات در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشته‌اند که از لحاظ آماری معنی دار است ( $P < 0/05$ ). همچنین بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ در رده سلولی HT29 تیمار شده با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم طی ۲۴ ساعت به ترتیب به میزان  $0/13 \pm 2/69$  ( $P = 0/0005$ ) و  $0/29 \pm 3/46$  ( $P = 0/0002$ ) افزایش یافت، همچنین نتیجه رنگ آمیزی DAPI و فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌های HT29 وارد آپوپتوز شده است [۴۹]. در تحقیق حاضر ارزیابی سمیت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سنتز شده به روش زیستی علیه رده سلولی کلیه جنین انسان (HEK293) به روش MTT انجام شد که تاثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر روی سلول‌ها نشان داد میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها بعد از گذشت ۴۸ ساعت حداقل بود، اما بعد از ۷۲ ساعت میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها افزایش یافت و تحلیل آماری توسط نرم افزار SPSS نشان داد که این افزایش در فعالیت حیاتی سلول‌ها بعد از ۷۲ ساعت از لحاظ آماری معنی دار است ( $P < 0/05$ ) و کمترین میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها بعد از گذشت ۴۸ ساعت  $0/54/12\%$  مربوط به غلظت  $0/1 \mu\text{g/ml}$  و بیشترین میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها بعد از گذشت ۷۲ ساعت  $100\%$  مربوط به غلظت  $5 \mu\text{g/ml}$  بود. لذا در این مورد تحقیق حاضر با مطالعه محقق مذکور مغایرت دارد. زیرا با

بیشترین میزان کاهش رشد کلنی‌ها مربوط به زمان ۹۰ دقیقه با غلظت ۲٪ نانوذرات و با تعداد کلنی  $70 \text{ cfu}$  نسبت به کنترل ( $p < 0/05$ ) گزارش شد که بیان کننده افزایش خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در برابر نور ماوراء بنفش به دلیل خاصیت فتوکاتالیتیکی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم می باشد بنابراین نتایج تحقیق حاضر با محققین مذکور هم خوانی دارد. Babaei و همکارانش در سال ۲۰۱۶ با مطالعه اثر ضد میکروبی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و دی اکسید تیتانیوم فتوکاتالیست بر باکتری اشرشیا کلی اثر مطلوب نانوذرات دی اکسید تیتانیوم فتوکاتالیست را در کاهش جمعیت باکتری اشرشیا کلی نسبت به نانوذرات دی اکسید تیتانیوم نشان داد [۲۶]. Ahmad و همکاران در سال ۲۰۱۳ با مطالعه بر روی اثر ضدباکتریایی نانوذرات در باکتری اشرشیا کلی نشان دادند که نانوذرات دی اکسید تیتانیوم دارای فعالیت ضدباکتریایی قوی هستند. نانوذرات برای غیرفعال کردن آنزیم‌های سلولی و DNA با اتصال به الکترون‌های گروه‌های کربوکسیلات، آمیدها، ایندول، هیدروکسیلاز، گروه‌های تیول و غیره باعث افزایش نفوذپذیری منافذ کوچک دیواره سلولی باکتریایی شده و در نتیجه باعث مرگ سلول می گردند [۴۷]. نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضدباکتری اشرشیا کلی توسط نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در این مطالعه با محققین مذکور هم خوانی دارد و نانوذرات در مواجهه با باکتری باعث کاهش رشد کلنی‌های باکتری شد. Saadat و همکاران در سال ۲۰۱۱ با ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نانوذره دی اکسید تیتانیوم نشان دادند که نانوذرات قدرت مهارکنندگی  $2/2 \mu\text{g}$  علیه باکتری سودوموناس آئروجینوزا را دارد. همچنین نتایج XRD و SEM نشان داد که نانوذره دی اکسید تیتانیوم ذراتی کروی و با قطر  $40-65 \text{ nm}$  می باشند که تاییدی بر ساختار نانوذرات دی اکسید تیتانیوم می باشد [۴۸]. در تحقیق حاضر حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) نانوذرات بر علیه باکتری اشرشیا کلی  $256 \mu\text{g/ml}$  بوده که اختلاف زیاد نتیجه با تحقیق انجام شده توسط Saadat و همکاران به دلیل روش تولید نانوذرات

#### ۴- نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد نانوذرات سنتز شده روی کاهش رشد باکتری اشرشیا کلی و همچنین کاهش بیان ژن clbB و clbN باکتری موثر هستند و اثر سمیت پائینی بر روی سلولها دارند. بنابراین می توان با استفاده از نانوذرات اصلاح شده برای تحویل هدفمند و انتخابی دارو به بافت سرطان اشاره کرد. با توجه به اثرات ضدمیکروبی و قابل توجه نانوذرات، پیشنهاد می گردد با استمرار این گونه مطالعات در آینده بر روی مدل های مختلف حیوانی محل اثر این ترکیبات را در سلول های باکتریایی و قارچی شناسایی نمود و با بدست آوردن اطلاعات بیشتر در خصوص سایر خواص ضدمیکروبی چنین ترکیباتی امید آن می رود که بتوان از آن ها در زدودن آلودگی های میکروبی سطوح و به ویژه در موارد بالینی استفاده نمود.

#### مراجع

- [1] S. Wu, S. Powers, W. Zhu, *Nature*, **529**, 2016, 43.
- [2] L.A. Torre, F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. Jemal, C.A. Cancer *J. Clin*, **65**, 2015, 87.
- [3] J.P. Nougayrède, S. Homburg, F. Taieb, M. Boury, E. Brzuszkiewicz, G. Gottschalk, *Science*, **313**, 2006, 848.
- [4] L. Guerra, R. Guidi, T. Frisan, *Febs Journal*, **278**, 2011, 4577.
- [5] CA. Brotherton, EP. Balskus, *American Chemical Society*, **16**, 2013, 1155.
- [6] G. Cuevas-Ramos, CR. Petit, I. Marcq, M. Boury, E. Oswald, J. Nougayrède, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 2010, 537.
- [7] M. Fock, *Aliment Pharmacol Ther*, **40**, 2014, 250.
- [8] M. Szymanski, R. Porter, *J Immun Methods*, **387**, 2013, 262.
- [9] V. Prabhu, S. Uzzaman, V. Grace, C. Guruvayoorappan, *J Cancer Therapy*, **2**, 2011, 325.
- [10] M.H. Darvishi, A. Nomani, H. Hashemzadeh, M. Amini, M. A. Shokrgozar, R. Dinarvand, *Biotechnol Appl Biochem*, **64**, 2017, 423.
- [11] S. Janfaza, M.B. Nojavani, M. Nikkhah, T. Alizadeh, A. Esfandiari, M.R. Ganjali, *Mikrochim Acta*, **186**, 2019, 137.
- [12] H. Hashemzadeh, A. Allahverdi, E. Peter, Modares *J. Biotechnol*, **10**, 2019, 573.
- [13] J. Esfandiyari, B. Shojaedin. Givi, M. Mozafarnia, H. Hashemzadeh, H. Naderimaneh, *Modaers J. Biotechnol*, **10**, 2019, 581.

بررسی های انجام شده توسط روش Real Time PCR نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با داشتن خاصیت ضدباکتریایی، ضدسرطانی و خاصیت فتوکاتالیتیکی توانست ۲۰/۴۴٪ میزان بیان ژن clbB و clbN باکتری اشرشیا کلی عامل سرطان کولورکتال را کاهش دهد و با بررسی آزمایش MTT و کاهش میزان سمیت این نانوذرات نسبت به سلولها می توان از این نانوذره در درمان سرطانها و بیماری های میکروبی بهره جست. یکی از موضوعات مهم در زمینه استفاده از نانوذرات فلزی در درمان سرطان، عدم سمیت سلولی نانوذرات بر روی سلول های نرمال است. مطالعات نشان می دهد که نانوذرات TiO<sub>2</sub> بر رده های سلول سرطانی تأثیر بیشتری دارد که این پدیده به دلیل اثر مستقیم آن ها بر روی سامانه تنفسی سلول در میتوکنندری می باشد. بنابراین با توجه به میزان فعالیت بالای میتوکنندری در فرآیند تنفس سلول های سرطانی نسبت به سلول های طبیعی، بستر مناسبی برای نانوذره TiO<sub>2</sub> تخریب سلول های سرطانی فراهم می شود. یکی دیگر از دلایل، تفاوت های ریخت شناسی بین غشاء سلول های سرطانی و طبیعی از لحاظ تفاوت اندازه منافذ آن ها می باشد. همچنین اختلاف در شکل، اندازه و بار سطحی نانوذرات عامل دیگر در تفاوت میزان سمیت نانوذرات بین سلول های سرطانی و نرمال می باشد. Brune و همکاران سال ۲۰۱۴، تأثیر نانوذرات TiO<sub>2</sub> را بر روی اپیتلیال گوارشی در شرایط آزمایشگاهی و بدن موجود زنده مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات TiO<sub>2</sub> از اپیتلیال ایلتوم و کولون عبور کرده و آگلومره می شود. در شرایط آزمایشگاهی این نانوذرات در سلول های M و سلول های مخاطی تجمع پیدا می کنند، اما بطور قابل توجهی سمیت سلولی و آپوپتوز را القا نمی کنند [۵۰] و این نکته در زمینه عدم سمیت سلولی این نانوذره بر روی سلول های نرمال و سالم بسیار حایز اهمیت است که بتوان در آینده به عنوان کاندید دارویی ضدسرطان مورد استفاده قرار گیرد.

- [33] D. Dhanasekaran, G. Rajakumar, P. Sivamani, S. Selvamani, A. Panneerselvam, N. Thajuddin, *Internet J Microbiol*, **1**, 2004, 7.
- [34] S. Kajal, K. Gajanan, K. Pawan, J. Chetan, *Journal of Microbiology & Experimentation*, **8**, 2008, 36.
- [35] A. Vishnu Kirthi, A. Abdul Rahuman, G. Rajakumar, S. Marimuthu, *Materials letters*, **65**, 2011, 2745.
- [36] J.R. Cole, B. Chai, R.J. Farris, Q. Wang, S.A. Kulam, D.M. McGarrel, G.M. Garrity, J.M. Tiedje, *Nucleic Acids Resrarch*, **33**, 2005, 294.
- [37] F. Dastjani Farahani, S. Mohammad Ganji, M. Sohrabi, *Iranian Journal of Medical Microbiology*, **9**, 2015, 26.
- [38] J.C. Arthur, E. Perez Chanona, M. Mühlbauer, S. Tomkovich, J.M. Uronis, T.J. Fan, B.J. Campbell, *Science*, **338**, 2012, 120.
- [39] I.E. Robledo, E.E. Aquino, G.J. Vazquez, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**, 2011, 2968.
- [40] Z. Jaderi, A. Maskooki, S.A. Mortazavi, *Journal of research and innovation in food science and technology*, **1**, 2012, 47.
- [41] T. Verdier, M. Coutand, A. Bertron, C. Roques, *Coatings*, **4**, 2014, 670.
- [42] Y. Cai, M. Stromme, K. Welch, *Plos one*, **8**, 2013, 1.
- [43] T. Shimpoh, Y. Hirata, S. Ihara, N. Suzuki, *Gut pathogens*, **9**, 2017, 1.
- [44] R.G. Moreno, I.E. Robled, A.B. Ortiz, *Advances in microbiology*, **4**, 2014, 1065.
- [45] S. Ahmad, A. Ahmad, K.B. Schneider, C.W. White, *International Journal of Toxicology*, **25**, 2006, 17.
- [46] C. Ripdles. Avila, M. Martinez. Garcia, A.S. Hascoet, J. Rodriguez, *Journal of Food*, **17**, 2019, 408.
- [47] R. Ahmad, M. Sardar, *International journal of innovative research in science engineering and technology*, **2**, 2013, 3569.
- [48] M. Saadat, S. Rudbar Mohammadi, *Scientific Research*, **2**, 2011, 497.
- [49] F. Shokrolahi, E. Aliasgari, A. Mirzaie, *Iran South Med J.*, **21**, 2019, 426.
- [50] E. Brun, F. Barreau, G. Veronesi, *Part Fibre Toxicol*, **11**, 2014, 13.
- [14] H. Hashemzadeh, A. Allahverdi, M. Ghorbani, *Micromachines*, **11**, 2020, 50.
- [15] H. Hashemzadeh, H. Javani, M. H. Darvishi, *Sci Rep*, **10**, 2020, 1837.
- [16] S. Cesmeli, C. Biray-Avci, *J. Drug Target*, **27**, 2019, 762.
- [17] R.U. Maheswari, A.L. Prabha, V. Nandagopalan, V. Anburaja, *Journal of harmacy and Biological Sciences*, **1**, 2012, 38.
- [18] S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao, D. Dash, *Nanotechnology*, **18**, 2007, 1.
- [19] M. Kamali, S. Ghorashi, M.A. Asadollahi, *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering*, **31**, 2012, 21.
- [20] S.K. Bajpai, M.M. Yallapu, M. Bajpai, V. Thomas, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **7**, 2007, 2994.
- [21] O. Choi, K.K. Deng, N.J. Kim, N.J. Ross, L. Jr, R.Y. Surampalli, Z. Hu, *Water Res*, **42**, 2008, 3066.
- [22] D. Mandal, M.E. Bolander, D. Mukhopadhyay, G. Sarkar, P. Mukherjer, *Appl microbial biotechniz*, **69**, 2006, 485.
- [23] S. Minaeian, A.R. Shahverdi, A.S. Nohi, H.R. Shahverdi, *J. sci IAU*, **17**, 2008, 1.
- [24] A.J. Julson, D.F. Olis, *Applied catal B: Environmental*, **65**, 2006, 1.
- [25] M. Taran, M. Rad, M. Alavi, *BiolImpacts*, **8**, 2018, 81.
- [26] E. Babaei, A.R. Dehnad, N. Hajizadeh, H. Valizadeh, F. Reihani, *Appled food biotechnology*, **3**, 2016, 115.
- [27] B. Durairaj, S. Muthu, T. Xavier, *Advances in applied science research*, **6**, 2015, 45.
- [28] K.H. Ibrahim, J.A. Salman, *European scientific journal*, **10**, 2014, 324.
- [29] C. Malarkodi, K. Chitra, S Rajesh. Kumar, G. Gnanajobitha, K. Paulkumar, M. Vanajab, G. Annadurai, *Der pharmacia sinica*, **4**, 2013, 59.
- [30] J.W. Seo, H. Chung, M. Kim, J. Lee, I. Choiprof, *Small (Nano. Micro)*, **3**, 2007, 850.
- [31] J.C. Arthur, E. Perez-Chanona, M. Mühlbauer, S. Tomkovich, J.M. Uronis, T.J. Fan, B.J. Campbell, T. Abujamel, B. Dogan, A.B. Rogers, *Science*, **338**, 2012, 120.
- [32] R. Johnson, B. Johnston, A. Kuskowski, J.P. Nougayrede, E. Oswald, *Journal of clinical microbiology*, **46**, 2008, 3906.