

بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سنتز شده به روش زیستی، علیه

اشرشیا کلی عامل ایجاد سرطان کولورکتال

حمیده بابائی^۱، عباس اخوان سپهی^{۲*}، کیومرث امینی^۳، سارا سعادت‌مند^۴

۱- دانشجوی دکتری تخصصی رشته میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران،

ایران

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

۳- استادیار گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

۴- دانشیار گروه زیست شناسی گیاهی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

نویسنده مسئول: جناب آقای دکتر عباس اخوان سپهی

akhavanspahy@gmail.com

Tel: +989121547166

Fax: 021-22971474

آدرس پستی: تهران، میدان هروی، خیابان مکران جنوبی، کوچه بوستان دهم، دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی،

واحد تهران شمال، دفتر ریاست دانشکده. جناب آقای دکتر اخوان سپهی

چکیده

در این مطالعه اثر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سنتز شده توسط باکتری باسیلوس بر کاهش بیان ژن های *clbB* و *clbN* باکتری اشرشیا کلی عامل ایجاد سرطان کولورکتال بررسی گردید. سنتز نانوذرات دی اکسید تیتانیوم توسط باکتری باسیلوس تکونینسیس انجام شد. تشکیل نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با پیک جزیی در ۳۵۰ nm بوسیله طیف سنجی فرابنفش- مرئی و الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) نشان داده شد. اندازه و مورفولوژی نانوذرات توسط میکروسکوپی الکترونی روبشی (SEM) تعیین شد، بر اساس آنالیز SEM ذرات دارای ساختار کروی با اندازه حدود ۷۸/۱۷ - ۳۵/۷۶ nm می باشند که وجود نانوذرات را تایید می کند. آزمون ضد باکتریایی نانوذرات نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و با گذشت زمان از تکثیر باکتری اشرشیا کلی جلوگیری می کنند 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 تیمار را نشان داد که این کاهش از لحاظ آماری معنی دار 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 به طور معنی داری بعد از ۷۲ کاهش یافت. بیشترین میزان فعالیت حیاتی سلول ها بعد از ۷۲ ساعت مربوط به غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ به میزان ۸۹/۹۱٪ می باشد. نانوذرات با اثر بر کاهش رشد و کاهش بیان ژن *clb* باکتری اشرشیا کلی و سمیت پائینی که روی سلول های HEK293 داشت می تواند جهت درمان سرطان کولورکتال مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: سرطان کولورکتال، دی اکسید تیتانیوم، باسیلوس، ژن *clb*، اشرشیا کلی

Evaluation of antibacterial effect of biologically synthesized titanium dioxide nanoparticles against *Escherichia coli* causing colorectal cancer

¹ Ph.D. Student Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Associate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³ Associate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Markazi, Iran

⁴ Associate Professor of Biology, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Corresponding Author: akhavanspahy@gmail.com

Tel: +989121547166

Abstract

In this study, was investigated the effect of titanium dioxide nanoparticles synthesized by Bacillus bacteria on reducing the expression of *Escherichia coli clb* genes causing colorectal cancer. The synthesis of titanium dioxide nanoparticles was performed by *Bacillus tequilensis* and for confirmation was investigated by visible ultraviolet (UV-vis) spectroscopy (XRD), infrared (FTIR) and electron microscopy Scanning (SEM), the effect of titanium dioxide nanoparticles were examined on growth reduction and expression of *Escherichia coli clb* gene was calculated by Real Time PCR, nanoparticles cytotoxicity percentage on HEK293 cell line was calculated by MTT method. XRD analysis confirmed the formation of titanium dioxide nanoparticles and showed the UV-vis absorption peak at 350 nm. The results of SEM images showed the nanoparticles to be spherical with an average of 17.78- 76.35 nm which confirms the existence of nanoparticles. The nanoparticles reduced the growth of *Escherichia coli* bacterium and decreased the expression of *clbB* and *clbN* genes, which is statistically significant. The toxicity of nanoparticles on HEK293 cell line was investigated by MTT method after 48 and 72 hours, MTT results showed that titanium dioxide nanoparticles had a dose-dependent and time-dependent toxicity effect and their amount decreased significantly after 72 hours. The highest rate of vital activity of cells after 72 hours was related to the concentration of 100 μ / $g\mu$ at 89.91%. Nanoparticles can be considered for the treatment of colorectal cancer due to their effect on growth retardation as well as reduced expression of *Escherichia coli clb* gene and low toxicity on HEK 293 cells.

Keywords: Colorectal cancer, Titanium dioxide, *Bacillus*, *clb* gene, *Escherichia coli*

۱- مقدمه

با وجود پیشرفت های قابل توجه در فناوری های پزشکی برای تشخیص و درمان سرطان، این بیماری هنوز به عنوان عامل تهدید کننده مرگ و میر مطرح است [۱]. در این میان سرطان کولون یکی از شایع ترین بدخیمی ها در مردان و زنان به شمار می رود و سالانه باعث مرگ بسیاری از افراد در جهان می شود [۲]. سرطان کولورکتال سومین سرطان رایج و چهارمین دلیل مرگ و میر در جهان است. این سرطان در ایران پس از سرطان معده، مثانه و پروستات در مردان چهارمین سرطان بوده و در زنان بعد از سرطان سینه دومین سرطان محسوب می شود. محققان با بررسی های بیشتر نشان دادند افزایش تعداد باکتری های *اشرشیا کلی* واجد ژن *pks* با آسیب رساندن به DNA سلول های پوشش روده سبب ایجاد سرطان کولورکتال می گردد. از نظر فیلوژنی *اشرشیا کلی* به چهار گروه A, B, B2, D تقسیم می شوند. برخی از سویه های *اشرشیا کلی* همزیست، از گروه فیلوژنیک B2 حامل

یک جزیره ی بیماری زای پلی کتاید سنتتاز هستند (*PKS*) که آنزیم مورد نیاز برای سنتز یک پپتید پلی کتاید ژنوتوکسین به نام کلی باکتین کد می نماید [۳]. آنزیم های مورد نیاز جهت سنتز کلی باکتین توسط محدوده ژنی با اندازه ۵۴kb رمز و بیان می شود و محل این ژن در لوکوس *ans W* از *tRNA* واقع شده است. محدوده ی ژنومی سنتز کننده کلی باکتین از ۳ تا *NRPS*، ۳ تا *PKS*، ۲ هیبرید *NRPS/ PKS* و ۹ آنزیم کمکی ویرایشی و برش دهنده شامل *Cib N*، *Cib K*، *Cib J*، *Cib I*، *Cib H*، *Cib*، *Cib D* و *Cib A*، *Cib B*، *C*، *Cib B*، *C*، *Cib A*، *Cib B* و *Cib D* تشکیل شده است [۴]. خواص شیمیایی کلی باکتین به علت وجود سه آنزیم *Cib B*، *Cib N* و *Cib P* است که در سنتز و طولیل شدن و شکست فولدینگ کلی باکتین نقش دارند. در ابتدا *Cib N* و به همراه *Cib B* و *NRPS/ PKS* باعث تولید *Pre colibactin* در فضای سیتوپلاسمی باکتری شده و سپس با عبور از کانال ها وارد فضای پری پلاسمیک می شود و در آنجا توسط *Cib P* به کلی باکتین تبدیل می شود. کلی باکتین می تواند با عبور از غشای خارجی باکتری ترشح شده و روی سلول های انتروسیت روده میزبان اثر سایتوتوکسیک گذارد. کلی باکتین با فعال شدن مسیر سیگنالینگ باعث آسیب به *DNA* می شود. بدین ترتیب که ابتدا پروتئین *Ataxia Telangiectasia Mtated (ATM)* را در پاسخ به آسیب *DNA* فعال می کند و باعث فسفریله شدن *Cdk2* و سپس فسفریله شدن *Cdc25c* می گردد. در انتها نیز *Cdk1* (با ایفای نقش در چک پوینت *G2* چرخه تقسیم سلولی میوز)، فسفریله شده و مقادیر زیاد *tyr-15* غیر فعال فسفریله از *Cdk1* نمایان می شود. همچنین هیستون *γH2AX* و چرخه سلول در مرحله ی *G2* متوقف می گردد و این اختلال در سیکل سلولی منجر به ایجاد سرطان کولون می شود [۵،۶]. امروزه بسیاری از گزینه های درمانی سرطان شامل جراحی، شیمی درمانی، پرتو درمانی در دسترس است [۷] این درحالی است که در بیشتر موارد سلول های سالم نیز دچار مرگ می شوند و می تواند عوارض جانبی در بیمار به همراه داشته باشد. بنابراین نیاز به جستجو در شیوه های نوین درمانی برای کنترل سرطان ضروری می باشد [۸] در این میان علم نانو تکنولوژی 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 آن ها بر روی سلول های طبیعی، رواج بیشتری یافته است [۱۰،۱۱،۱۲،۱۳]. نانو بیوتکنولوژی یکی از جدیدترین حوزه های نوظهور علم است که رابط بین زیست شناسی و فناوری نانو، تجزیه، تحلیل و ایجاد نانو ساختارهای کاربردی جدید است [۱۴]. چالش برنگیزترین تحقیقات فناوری نانو در درمان سرطان، کشف نانو ساختارهایی 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 نانو ساختارهای دی اکسید تیتانیوم برای دستیابی به این هدف است. نانوذرات دی اکسید 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]. روش های گوناگونی برای تهیه نانوذرات فلزی وجود دارد مانند احیای شیمیایی، هیدروترمال، میکروامولسیون و استفاده از لیزر [۱۷]، که در میان آن ها سنتز نانوذرات فلزی به روش شیمیایی بطور گسترده ای مورد استفاده قرار می گیرد [۱۸]، این گونه روش ها که به نام روش های شیمیایی شناخته می شوند بسیار پر هزینه بوده و در فرایند تهیه نانوذره ها از مواد شیمیایی مضر، سمی و بسیار خطرناکی استفاده می شود [۱۹] که منجر به ایجاد مشکلات زیست محیطی می شوند [۲۰] بنابراین محققان به دنبال روش جایگزین و سازگار با محیط زیست برای تهیه نانوذره های فلزی هستند. در سال های اخیر سنتز زیستی توجه بیشتری را نسبت به روش های فیزیکی و شیمیایی به خود اختصاص داده است [۲۱]. بیوسنتز نانوذرات با روش های زیستی توسط میکروارگانیسم ها، به دلیل سازگاری بالا با محیط زیست

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 به فرد در نانوذره دی‌اکسید 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 دی‌اکسید تیتانیوم را به شکل کروی و در سایز ۱۰۴/۶۳-۲۷/۷۵ nm به روش زیستی سنتز کردند و سپس خواص ضد باکتریایی 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 دی‌اکسید تیتانیوم در حضور نور و عدم حضور نور ماوراء بنفش در مقابل باکتری *اشرشیا کلی*، نشان دادند که جمعیت باکتری *اشرشیا کلی* به طور قابل توجهی در برابر نانوذرات در حضور نور ماوراء بنفش کاهش می‌یابد که این موضوع اشاره به افزایش خاصیت ضد میکروبی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در حضور نور، به دلیل خاصیت فتوکاتالیستی آن می‌باشد [۲۶]. Duraivaj و همکاران سال ۲۰۱۵ در هندوستان نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم را در ابعادی با میانگین ۹۰/۲۴ nm و کروی شکل توسط روش زیستی با استفاده از قارچ *آسپرژیلوس نیجر* سنتز کردند و سپس نشان دادند که فعالیت ضد باکتریایی 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 دی‌اکسید تیتانیوم را با ابعاد با میانگین ۷۰/۹۸ nm از باکتری *لاکتوباسیلوس کریسیاتوس* جدا شده از واژن خانم‌های عراقی سنتز کردند و سپس با بررسی خاصیت ضد باکتریایی آن‌ها در مقابل باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلبسیلا پنومونیه*، *اشرشیا کلی* و *اسینتوباکتر بومانی* نشان دادند که بیشترین خاصیت ضد باکتریایی بر علیه باکتری *اشرشیا کلی* با نتیجه چهار بار مثبت می‌باشد [۲۸]. Malarkodi و همکاران سال ۲۰۱۳ در هندوستان نانوذرات دی‌اکسید 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 ضد باکتریایی آن‌ها نیز افزایش می‌یابد [۲۹]. Seo و همکاران در سال ۲۰۰۷ با بررسی دی‌اکسید تیتانیوم بر روی سلول‌های سرطانی پوست نشان دادند که محلول دی‌اکسید تیتانیوم در حضور نور ماورا بنفش می‌تواند باعث درمان سلول‌های سرطانی پوست شوند که این هم نشان دهنده خاصیت فتوکالیستی نانوذرات دی‌اکسید 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 باکترین را بررسی و بیان کرده دو ژن *clbB* و *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 ژن های سرطان زایی میکروارگانسیم های 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 میکروارگانسیم ها از نظر هزینه، مصرف انرژی و ایمنی، نسبت به روش های فیزیکی و شیمیایی برتری دارد. از سوی دیگر تولید نانوذرات در جنس، گونه و سویه های مختلف باکتریایی متغیر است. باسیلوس ها باکتری هوازی، تحمل کننده اکسیژن و دارای اسپور است که می تواند حتی در شرایط سخت و نامطلوب زنده بماند که این خاصیت آن ها را به عنوان یک کاندیدای مناسب برای بیوسنتز نانوذرات فلزی مانند TiO_2 ساخته است. از قابلیت های مهم باکتری انتخاب شده سنتز نانوذرات فلزی و یا اکسید آن ها است. اکنون می توان با استفاده از روش های بهینه که در آن میکروارگانسیم های موجود در خاک مثل باکتری باسیلوس و تولید نانوذرات دی اکسید تیتانیوم از آن ها و اثر بخشی این نانوذرات بر روی باکتری *اشرشیا کلی* مولد ژن های *clbB* و *clbN* باعث مهار بیان این ژن ها 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 تکوئینسیس* جدا شده از خاک معادن 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 بی خطر بودن این نانوذرات در آینده جهت مصارف پزشکی و خوراکی اثر سمیت این نانوذرات بر روی رده سلول های نرمال HEK293 توسط آزمون MTT مورد مطالعه قرار گرفت.

۲- فعالیت های تجربی:

الف) نمونه برداری از خاک و جداسازی باکتری های باسیلوس: جداسازی باکتری های مولد نانوذرات دی اکسید تیتانیوم، از نمونه های خاک معادن، تیتانیوم کهنوج، سرب قنات مروان، معدن آهن گوهر زمین و معدن مس سرچشمه واقع در استان کرمان انجام شد. به منظور جداسازی باسیلوس های موجود در نمونه های 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 شیک در ۱۵۰ rpm از سوسپانسیون ایجاد شده رقت 10^{-1} تا 10^{-3} تهیه و از کلیه رقت های مورد نظر، کشت سطحی در محیط کشت تریپتیک سوی آگار (مرک آلمان) استریل انجام شد و پس از گرمخانه گذاری در دمای $30^{\circ}C$ 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، نمونه ها 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 کلنی های باسیلوس، تلقیح کلنی ها به محیط کشت نوترینت براث (مرک آلمان) انجام و به مدت ۲۴ ساعت در دمای $30^{\circ}C$ و در دور ۱۵۰ rpm گرمخانه گذاری شدند. در ادامه کلیه محیط های مایع، در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و به محلول رویی 0.025 mol/l تیتانیوم هیدروکسید افزوده شد و به مدت ۱ ساعت روی شیکر قرار گرفت و در ادامه محلول در $60^{\circ}C$ به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری قرار داده شد و در صورت ایجاد رسوب سفید رنگ، توسط سانتریفوژ جداسازی و ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد و از رسوب حاصله بعد از خشک شدن جهت تایید نانوذرات دی اکسید تیتانیوم تحت آنالیزهای دستگاهی Ultraviolet spectroscopy (مدل دستگاه UV-160A ساخت شرکت Shimadzu ژاپن)، X-ray diffraction (مدل دستگاه PW1730 ساخت شرکت Philips هلند)، 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 F:5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' و پرایمر ریورس R: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 ۳ 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 تأیید تکثیر DNA، محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد جریان یافت (مارکر استفاده شده ۱۰۰۰bp بود که از شرکت سیناکلون تهیه شد) و پس از اطمینان از حضور باند ۱۰۰۰bp، محصول PCR توسط شرکت تکاپو زیست تعیین توالی شد. همانندی توالی نوکلئوتیدهای ژن ۱۶SrRNA 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 /شرشیا کلی واجد ژن *clbN* و *clbB*: تعداد ۱۲ نمونه باکتری /شرشیا 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 *clbN* و *clbB*، از روش Duplex PCR استفاده شد. جهت استخراج DNA باکتری /شرشیا کلی از کیت استخراج DNA باکتری گرم منفی شرکت سینا ژن استفاده شد و برای ژن *clbB* از پرایمر فوروارد F:5'-GCGCATCCTCAAGAGTAAATA-3' و پرایمر ریورس R:5'-GCGCTCTAGTGCTCACAACC-3' و برای ژن *clbN* از پرایمر فوروارد F:5'-TCGATATAGTCACGCCACCA-3' و پرایمر ریورس R:5'-GTCAAGCGAGCATAACGAACA-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 *clbN* و *clbB*، 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 ۳ 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،۳۸،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 ضد باکتریایی 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 /شرشیا کلی (رقت ۰/۵ مک فارلند معادل $1/5 \times 10^8$ 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 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 ویولت 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 کانتر 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، ۴۱، ۴۲].

(و تعیین حداقل غلظت مهار کننده گی (MIC) باکتری *اشرشیا کلی* واجد ژن *xtlb* 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 هیتون برات استفاده شد و به هر یک از چاهک های میکروپلیت های ۱۰۰ μ l محیط کشت مولر هیتون برات و ۱۰۰ μ l از سوسپانسیون نانوذرات با غلظت اولیه ۱۰۲۴ μ g/ml به اولین چاهک اضافه شد و سپس تا ۱۲ چاهک رقت سازی متوالی به ترتیب انجام شد. سپس به هر چاهک ۱۰۰ μ l 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 شیکر دار (۳۷ °C و ۱۰۰ rpm) کدورت سنجی 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 سینازن، انجام شد و پس از اطمینان از کیفیت RNA با انجام الکتروفورز ژل آگارز از RNA توسط آنزیم ترانس کریپتاز نسخه برداری معکوس انجام م 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 μ l از هر پرایمر فوروارد و ریورس پرایمر برای ژن *16srRNA* F:5'_GGTGAATACGTTCCCGG_3' و پرایمر ریورس برای ژن *clb* R:5'_TACGGCTACCTTGTTACGATT_3' و پرایمر ریورس F:5'_AAGCCGTATCCTGCTCAAAA_3' و R:5'_GCTTCTTTGAGCGTCCACAT_3' (استفاده شد) ۱۰ μ l از cDNA، ۱۰ μ l Syber green master mix 2x با آب مقطر به ۲۰ μ l 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 °C 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 است و بر اساس شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز سلول های زنده استوار است. برای انجام این آزمایش، از میکروپلیت های کشت سلولی ۹۶ خانه ای استفاده می شود. بعد از کشت سلول های کلیه جنین انسان (Human embryonic kidney cells 293) در فلاسک های کشت سلولی، حجم ۱۰۰ µl محیط کشت حاوی سلول ها با تراکم ۲۰۰۰۰ عدد در هر چاهک قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، در معرض غلظت های صفر، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ µg/ml از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، به هر چاهک ۱۰۰ µl رنگ MTT (۳،۵،۴- دی متیل تیزولیل-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 CO₂ انکوبه شده و سپس مایع رویی هر چاهک خارج و ۱۰۰ µl دی متیل سولفوکساید (DMSO) یا ایزوپروپانول جهت حل نمودن کریستال های 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 سلول های 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 نرم افزار SPSS Ver 23 بررسی و P < ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد و پس از مشخص شدن اختلاف و تفاوت معنی داری در سطوح مختلف از طریق آزمون Duncan در هر دو زمان مشخص سطوح معنی داری تعیین گردید.

رابطه (۱)

درصد سمیت سلولی - 100 = درصد زندهمانی

رابطه (۲)

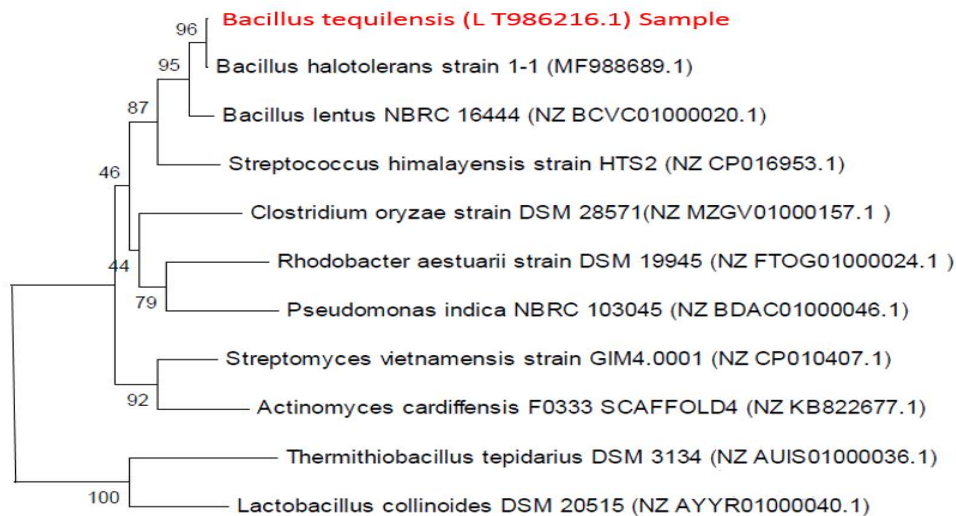
میانگین جذب در تیمار مورد نظر

$$\times 100 - 1 = \text{درصد سمیت سلولی}$$

میانگین جذب در تیمار کنترل

۳- نتایج و بحث

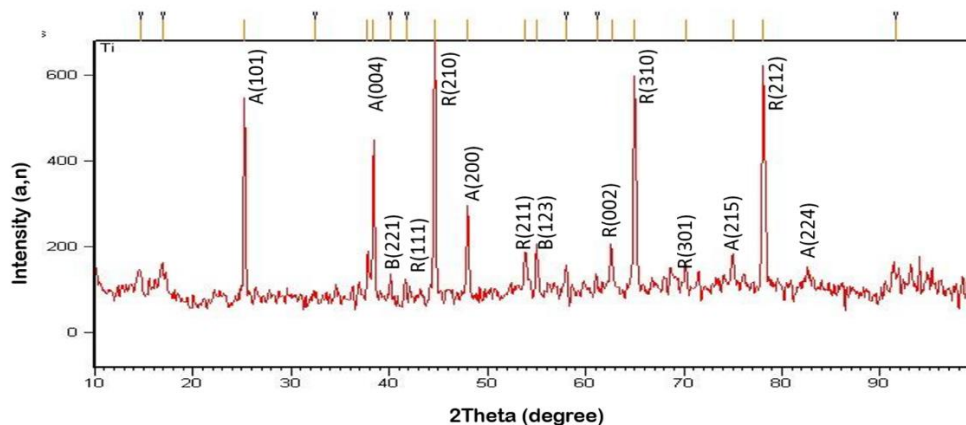
الف) نتایج حاصل از جداسازی باسیلوس های سنتز کننده نانوذرات دی اکسید تیتانیوم: از بین ۴۵ کلنی جداسازی و خالص شده از روش کشت مستقیم و تیمار حرارتی، که برای تولید نانوذرات دی اکسید تیتانیوم به کار گرفته شده بودند ۵ جدایه باکتری باسیلوس گزارش شد که تنها ۱ جدایه رسوب سفید رنگ بیشتری نسبت به سایر جدایه ها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



شکل ۱: درخت فیلوژنی، نشان دهنده ارتباط بین توالی ژن $16S rRNA$ باکتری باسیلوس تیکوئیلنسیس سویه LT986216 با دیگر باکتری ها را نشان می دهد اعداد واقع در گره کلادها نمایانگر ارزش (bootstrap 100%) است

ب) نتایج حاصل از طیف سنجی فرا بنفش نانوذرات دی اکسید تیتانیوم: در محدوده ۲۰۰ تا ۵۵۰ nm، وجود بالاترین پیک جذبی در طول موج ۳۵۰ nm با دستگاه طیف سنجی UV-vis گزارش شد که نشان دهنده سنتز زیستی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم می باشد.

ج) آنالیز پراش اشعه ایکس تشکیل کریستال های نانوذرات دی اکسید تیتانیوم را در نمونه تایید نمود. مطابق شکل ۲ پیک هایی 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، ۱۰۴، ۲۰۰، ۲۱۱، ۲۱۳، ۲۰۲، ۳۱۰، ۳۰۱، ۲۱۵، ۲۱۲ و ۲۲۴ دی اکسید تیتانیوم همخوانی داشت. هیچ گونه پیک از ناخالصی در الگوی پراش اشعه X مشاهده نشد بنابراین محصول مربوطه با خلوص بالا تهیه شده است.

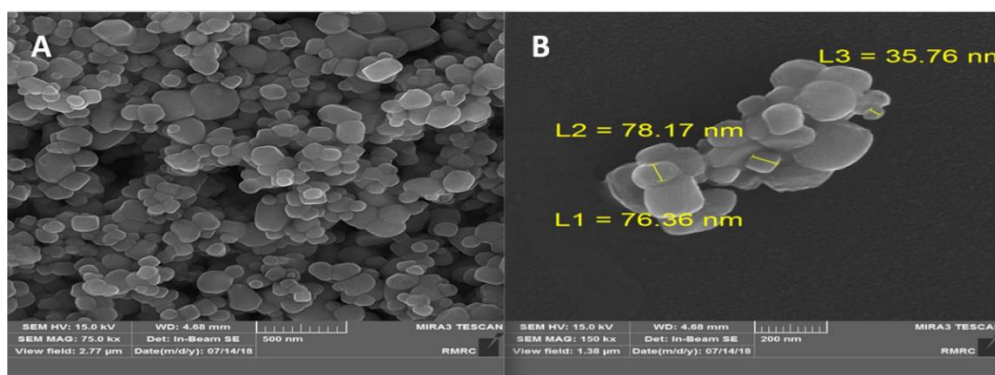


شکل ۲: الگوی پیک های حاصل از طیف پراش اشعه ایکس نانوذرات دی اکسید تیتانیوم

ساختارهای بلوری نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بصورت (A) آاناتاز، (B) بروکیت و (R) روتایل مشخص گردید.

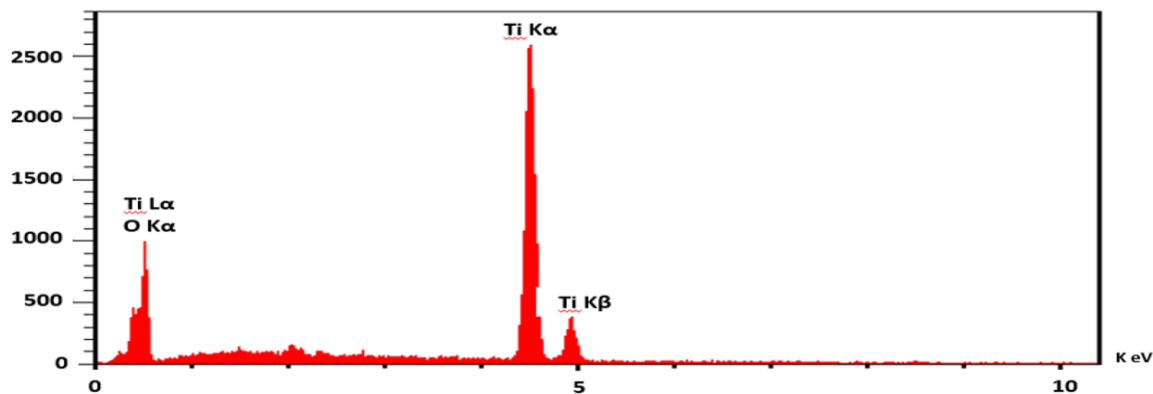
د) نتایج حاصل از آنالیز طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم نشان داد که پیک های جذبی در ناحیه $3200-3600\text{ cm}^{-1}$ مربوط به شیوه های ارتعاشی کششی متقارن O-H، در ناحیه $2800-2900\text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی C-H و در ناحیه 1670 cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمشی O-H می باشد. در نمونه اکسید فلزی تیتانیوم پیک در ناحیه 683 cm^{-1} دیده شد که بر شیوه های ارتعاشی کششی فلز اکسیژن تعلق دارد.

ه) نتایج حاصل از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی SEM نانوذرات دی اکسید تیتانیوم: با توجه به تصویر A در شکل ۳ که مربوط به بزرگنمایی 500 nm از نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی است شکل کروی نانوذرات کاملاً مشخص می باشد و در تصویر B با بزرگنمایی 200 nm نانوذرات قطری بین $17/78-76/35\text{ nm}$ دارند که تاییدی بر ساختار نانوذرات دی اکسید تیتانیوم می باشد (شکل ۳).



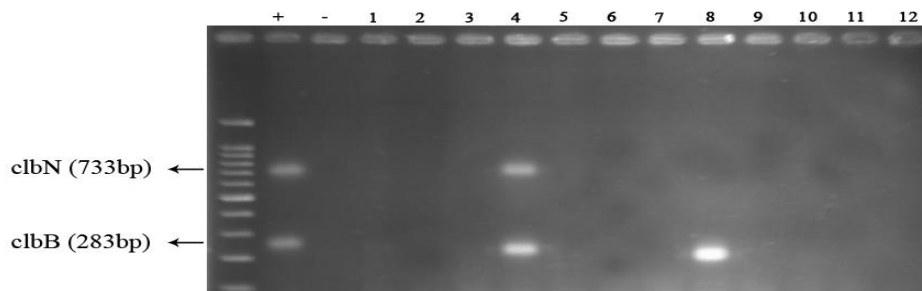
شکل ۳: تصویر A) تصویر میکروسکوپ الکترونی گرفته شده از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سنتز شده توسط باکتری باسیلوس تکوئیلینسیس با بزرگنمایی 500 nm ، تصویر B) تصویر میکروسکوپ الکترونی گرفته شده از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سنتز شده توسط باکتری باسیلوس تکوئیلینسیس با بزرگنمایی 200 nm

و) طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS): برای آنالیز عنصری ذرات، به طور تصادفی دو ذره از نمونه انتخاب و با EDS آنالیز شدند. شکل شماره ۴ نتایج آزمون EDS از این دو نقطه را نشان می دهد. در هر دو الگوی انرژی پرتو ایکس، اکسیژن و تیتانیوم شناسایی شدند. میزان تیتانیوم در این دو ذره، نزدیک به $6/72\%$ درصد وزنی است.



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

ز) نتایج حاصل از شناسایی ژن های *clbB* و *clbN* در جدایه های *اشرشیا کلی* 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 بررسی های بعدی در نظر گرفته شد.

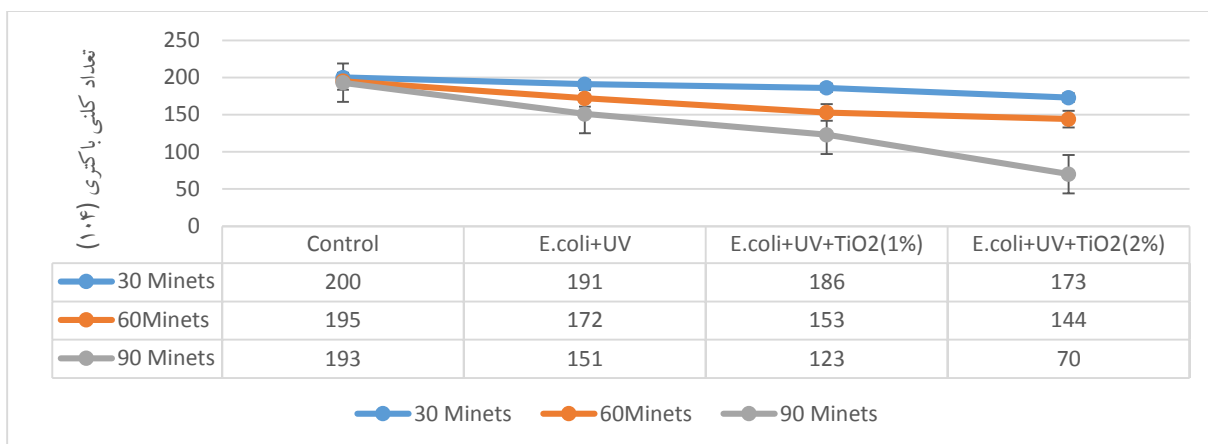


شکل ۵: فراوانی ژن های *clbB* و *clbN* در سویه های *اشرشیا کلی*، از سمت چپ به ترتیب ستون M: مارکر و ستون +: کنترل مثبت و ستون -: کنترل منفی و ستون های ۱ تا ۱۲ جدایه های *اشرشیا کلی* می باشد.
ح) نتایج حاصل از بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر علیه باکتری *اشرشیا کلی* واجد ژن *clb* در حضور و عدم حضور نور ماوراءبنفش: با توجه به نمودار، گذشت زمان و حضور نور ماوراءبنفش اثر قابل توجهی بر کاهش تعداد کلنی های باکتری نسبت به کنترل داشته که بیان کننده خاصیت فتوکاتالیتیکی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در برابر نور ماوراءبنفش می باشد. علاوه بر این با افزایش غلظت نانوذرات تعداد کلنی ها کاهش یافت که موضوع خاصیت ضد میکروبی نانوذرات را مشخص می کند.

و با آنالیز توسط نرم افزار 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 توجه به فاصله ای بودن متغیرها استفاده گردید. و با وجود $p \leq 0.05$ و عدد ضریب همبستگی یک (نشان دهنده 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 ی زمانی ۳۰ و ۶۰ دقیقه، ۳۰ و ۹۰ دقیقه و در محدوده زمان های ۶۰ و ۹۰ دقیقه وجود داشت و با توجه به اینکه $p \leq 0.5$ می باشد نشان دهنده این امر است که با گذشت زمان تعداد کلنی های باکتریایی کاهش یافته و رابطه معناداری بین گذشت زمان و کاهش رشد باکتری همراه با افزایش میزان غلظت نانوذره وجود دارد.

نمودار ۱: تعداد کلنی باکتری *اشرشیا کلی* در غلظت های متفاوت از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در حضور نور ماوراءبنفش

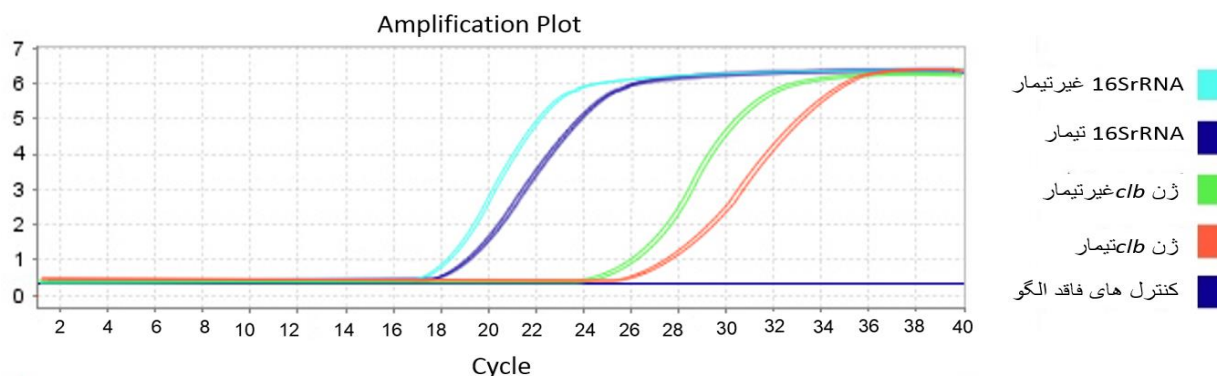
در زمان های مختلف

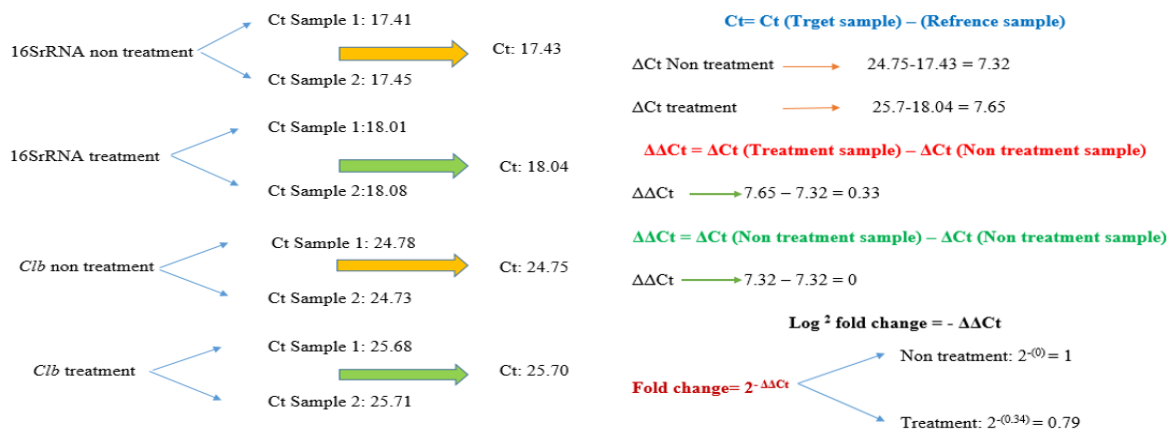


ط) نتایج حاصل از MIC: با توجه به کدورت سنجی، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) نانوذرات دی اکسید تیتانیوم برای باکتری *اشرشیا کلی* واجد ژن *clbB* و *clbN* ۲۵۶ $\mu\text{g/ml}$ گزارش شد بنابراین غلظت ۱۲۸ $\mu\text{g/ml}$ (Sub MIC) به عنوان باکتری تیمار شده توسط نانوذرات دی اکسید تیتانیوم جهت بررسی میزان بیان 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 ۲، در مقایسه نمودار تکثیر ژن *clb* و *16SrRNA* به عنوان Housekeeping قبل و بعد از مواجهه با نانوذرات مشخص شد که میزان ΔCt افزایش یافته است. Ct ژن *16SrRNA* در قبل و بعد از تیمار به ترتیب ۱۷/۴۳ و ۱۸/۰۴ بدست آمد. با توجه به اینکه اختلاف Ct قبل و بعد از تیمار با نانوذره دی اکسید تیتانیوم تنها ۰/۶۱ اختلاف دارد و این اختلاف ناچیز بوده بنابراین از ژن *16SrRNA* به عنوان ژن خانگی و استاندارد داخلی استفاده شده است. با توجه به شکل ۷ پیک اصلی در منحنی ذوب ژن *clb* در سویه *باسیلوس تکوئینسیس* تیمار شده با نانوذرات دمای $86/79^\circ\text{C}$ را نشان داد. ΔCt ژن *clb* در مواجهه با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم طبق شکل ۶ محاسبه گردید و نتایج در جدول ۱ آورده شد.

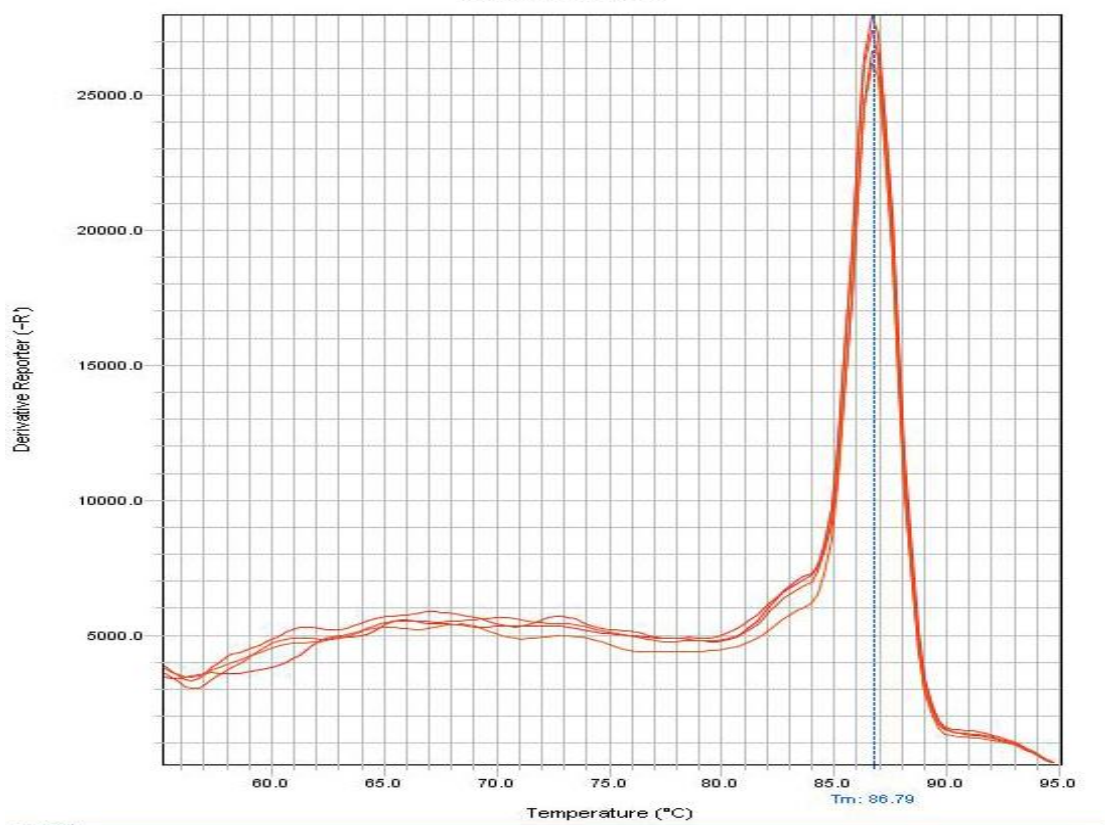
نمودار ۲: نمودار تکثیر ژن *clb* در قبل و بعد از تیمار با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و نمودار پیشرفت واکنش ژن *16SrRNA* به عنوان ژن Housekeeping به همراه Ct محاسبه شده





شکل ۶: نتایج حاصل از بررسی بیان ژن *clb* باکتری *اشرشیا کلی* تحت تاثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم توسط روش مولکولی

Real Time PCR Melt Curve



شکل ۷: منحنی ذوب ژن *clb* در سویه *باسیلوس تکوئیلینسیس* تیمار شده با نانوذره دی اکسید تیتانیوم نشان داد که منحنی های ژن مورد سنجش در تمام نمونه ها با هم منطبق و بصورت تک قله ای هستند.

جدول ۱: نتایج ΔCt ژن *clb* در مواجهه با نانوذره دی اکسید تیتانیوم

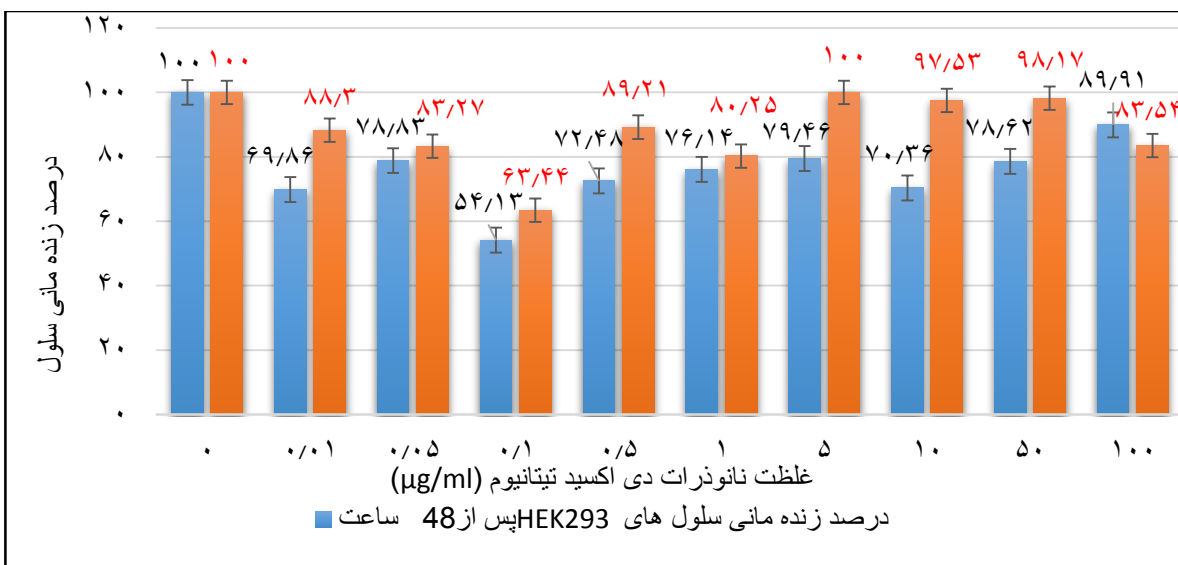
$\Delta\Delta Ct$ نمونه تیمار	$\Delta\Delta Ct$ نمونه کنترل	$\Delta\Delta Ct$ نمونه تیمار	$\Delta\Delta Ct$ نمونه کنترل	$\Delta\Delta Ct - 2$ نمونه تیمار	$\Delta\Delta Ct - 2$ نمونه کنترل
۷/۶۴	۷/۳۲	۰/۳۳	۰	۰/۷۹	۱

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 حالیکه هیچ تاثیری بر روی بیان ژن *16SrRNA* نداشته است.

ک) نتایج حاصل از آزمون سنجش سمیت دی اکسید تیتانیوم بر سلول ها:

با توجه به نمودار ۳، میزان فعالیت حیاتی سلول ها بعد از گذشت ۴۸ ساعت حداقل بود، اما بعد از ۷۲ ساعت میزان فعالیت حیاتی سلول ها افزایش یافت. کمترین میزان فعالیت حیاتی سلول ها به ترتیب بعد از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت مربوط به غلظت ۰/۱ $\mu\text{g/ml}$ و ۵۴/۱۳٪ و ۶۳/۴۳٪، بیشترین میزان فعالیت حیاتی سلول ها به ترتیب بعد از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت مربوط به غلظت ۵ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و ۸۹/۹۱٪ و ۱۰۰٪ بود. تحلیل آماری توسط نرم افزار SPSSver 23 و با استفاده از آزمون واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه ای Duncan و Paired T-Test بررسی شد. در آنالیز واریانس (ANOVA) جهت بررسی معنی دار بودن اختلاف بین میانگین های هر دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت بصورت جداگانه بررسی شد که مقدار $\text{sig}=0$ یا $\text{Pvalu}=0$ در هر دو زمان را نشان داد بنابراین با توجه به معنی دار بودن $\text{p}\leq 0.05$ نتیجه حاصل از آنالیز معنی دار بودن اختلاف بین سطوح تیمار و تاثیر گذاری آن را بر روی زنده مانی سلول را مشخص نمود. سپس اختلاف و تفاوت معنی داری با یکدیگر در زمان های 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 $\text{P}\leq 0.05$ در می یابیم اختلاف معنی داری بین سطوح مختلف تیمار با گذشت زمان و تاثیر گذاری آن ها بر روی زنده مانی سلول وجود دارد.

نمودار ۳: مقایسه درصد توانایی زنده مانی سلول های HEK 293 در مقابل غلظت های متفاوتی از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بعد از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت



یکی از ویژگی خاص نانوذرات دی اکسید تیتانیوم که باعث تمایز آن نسبت به دیگر نانوذرات فلزی شده اثرات فتوکاتالیتی قوی آن می باشد که اثرات ضد میکروبی آن را افزایش می دهد. از سه دهه گذشته تاکنون دی اکسید تیتانیوم به دلیل خواص متعدد بیولوژیکی، فیزیکی فتوکاتالیتی، ضد میکروبی، ضد سرطانی، 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 غلظت های متفاوتی از دو نوع مختلف نانوذره دی اکسید تیتانیوم به نام های NM101 (شکل کریستال آناناز نانوذره با اندازه ۷ nm) و NM105 (شکل کریستالی آناناز-روتایل نانوذره با اندازه ۲۱ nm) با حضور و عدم حضور نور UV با طول موج ۳۱۵-۴۰۰ nm در زمان های ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۲ دقیقه و به مدت ۲۴ ساعت بر روی گروهی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی از جمله باکتری *اشرشیا کلی* نشان دادند که کاهش ۲ تا ۳ سیکل لگاریتمی کلنی های باکتریایی تنها با همبستگی بین غلظت های بالای نانوذرات، وجود نور و گذشت زمان امکان پذیر خواهد بود و این نتیجه در مورد هر دو نوع مختلف نانوذره دی اکسید تیتانیوم صادق بود و آنالیز داده ها رابطه معنی دار بودن ($p < 0/05$) را نسبت به گروه شاهد نشان می دهد [۴۶]. Jaderi و همکاران سال ۲۰۱۲ با بررسی اثر غلظت های 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 معنی داری نسبت به نمونه شاهد پیدا نموده است. هرچند غلظت تیتانیوم دی اکساید به تنهایی نمی تواند ملاک بررسی قرار گیرد و میزان پرتو دهی توسط UV به صورت توأمان سبب کشندگی میکرواورگانیسم ها می گردد. اما تأثیر غلظت به تنهایی معرف افزایش کشندگی با افزایش غلظت است. در غلظت ۱٪ نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر باکتری *اشرشیا کلی* 10^4 cfu نسبت به نمونه شاهد $10^4 \times 400$ را نشان دادند کاهش قابل ملاحظه ای دارد و در این غلظت دی اکسید تیتانیوم توانسته است ۲ سیکل لگاریتمی بار میکروبی را کاهش دهد ($p < 0/05$) در غلظت ۲٪ از نانو ذره دی اکسید تیتانیوم نتیجه مشابهی دیده شد. جمعیت میکروبی از $10^4 \times 400$ به 10^4 کاهش پیدا کرد که نشان دهنده آن است که دی اکسید تیتانیوم در این غلظت ها توانست جمعیت میکروبی را حدود ۲ سیکل لگاریتمی کاهش دهد [۴۰]. اثر قاطع نبودن کشندگی نانو ذرات تیتانیوم اکساید توسط دیگر محققین نیز تایید شده است و علاوه بر آن نتایج حاصل از مطالعه حاضر با بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر علیه

باکتری *اشرشیا کلی* واجد ژن *clb* در حضور و عدم حضور نور ماوراءبنفش با غلظت های 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 کلنی های باکتری *اشرشیا کلی* نسبت به نمونه کنترل داشته در نتیجه بیشترین میزان کاهش رشد کلنی ها مربوط به زمان ۹۰ دقیقه با غلظت ۲٪ نانوذرات و با تعداد کلنی ۷۰ cfu نسبت به کنترل ($p < 0/05$) گزارش شد که بیان کننده افزایش خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در برابر نور ماوراءبنفش به دلیل خاصیت فتوکاتالیتیکی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم می باشد بنابراین نتایج تحقیق حاضر با محققین مذکور همخوانی 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 ضد باکتریایی نانوذرات در باکتری *اشرشیا کلی* نشان دادند که نانوذرات دی اکسید تیتانیوم دارای فعالیت ضدباکتریایی قوی هستند. نانوذرات برای غیر فعال کردن آنزیم های سلولی و DNA با اتصال به الکترون های گروه های کربوکسیلات، آمیدها، ایندول، هیدروکسیلاز، گروه های تیول و غیره باعث افزایش نفوذ پذیری منافذ کوچک دیواره سلولی باکتریایی شده و در نتیجه باعث مرگ سلول می گردند [۴۷]. نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد باکتری *اشرشیا کلی* توسط نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در این مطالعه با محققین مذکور همخوانی دارد و نانوذرات در مواجهه با باکتری باعث کاهش رشد کلنی های باکتری شد. Saadat و همکاران در سال ۲۰۱۱ با ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی نانوذره دی اکسید تیتانیوم نشان دادند که نانوذرات قدرت مهارکنندگی ۲/۲ μg علیه باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* را دارد. همچنین نتایج XRD و SEM نشان داد که نانوذره دی اکسید تیتانیوم ذراتی کروی و با قطر ۴۵-۶۵ 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* ۲۵۶ $\mu\text{g/ml}$ بوده که اختلاف زیاد نتیجه با تحقیق انجام شده توسط Saadat و همکاران به دلیل روش تولید نانوذرات می باشد که آن ها 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 ضد باکتریایی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در این تحقیق با نتایج محقق مذکور همخوانی دارد. Shokrolahi و همکاران در سال ۲۰۱۸ با بررسی اثر سمیت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر روی رده سلولی سرطان کلون HT29 در غلظت های مختلف نانوذرات توسط روش MTT نشان دادند که نانوذرات در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشته اند که از لحاظ آماری معنی دار است ($P < 0/05$). همچنین بیان ژن های کاسپاز ۳ و ۹ در رده سلولی HT29 تیمار شده با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم طی ۲۴ ساعت به ترتیب به میزان ($P = 0/0005$) $2/69 \pm 0/13$ و ($P = 0/0006$) $3/46 \pm 0/29$ ($P = 0/0002$) افزایش یافت، همچنین نتیجه رنگ آمیزی DAPI و فلوسیتومتری نشان داد که سلول های 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 سلول ها نشان داد میزان فعالیت حیاتی سلول ها بعد از گذشت ۴۸ ساعت حداقل بود، اما بعد از ۷۲ ساعت میزان فعالیت حیاتی سلول ها افزایش یافت و تحلیل آماری توسط نرم افزار SPSS نشان داد که این افزایش در فعالیت حیاتی سلول ها بعد از ۷۲ ساعت از لحاظ آماری معنی دار است ($P < 0/05$) و کمترین میزان فعالیت حیاتی سلول ها بعد از گذشت ۴۸ ساعت ۵۴/۱۲٪ مربوط به غلظت ۰/۱ $\mu\text{g/ml}$ و بیشترین میزان فعالیت حیاتی سلول ها بعد از گذشت ۷۲ ساعت ۱۰۰٪ مربوط

به غلظت ۵ µg/ml بود لذا در این مورد تحقیق حاضر با مطالعه محقق مذکور مغایرت دارد زیرا با بررسی های انجام شده توسط روش Real Time PCR نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با داشتن خاصیت ضد باکتریایی، ضد سرطانی 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 سلول ها می توان از این نانوذره در درمان سرطان ها 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 TiO₂ 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 فرایند تنفس سلول های سرطانی نسبت به سلول های طبیعی، بستر مناسبی برای نانوذره TiO₂ 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 TiO₂ را بر روی اپیتلیال گوارشی در شرایط آزمایشگاهی و بدن موجود زنده مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات TiO₂ از اپیتلیال ایلئوم و کولون عبور کرده و آگلومره می شود. در شرایط آزمایشگاهی این نانوذرات در سلول های M و سلول های مخاطی تجمع پیدا میکنند اما به طور 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.

۴- نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد نانوذرات سنتز شده روی کاهش رشد باکتری *اشرشیا کلی* و همچنین کاهش بیان ژن *clbN* و *clbB* باکتری موثر هستند و اثر سمیت پائینی بر روی سلول ها 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 ضد میکروبی 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 به دست آوردن اطلاعات بیشتر در خصوص سایر خواص ضد میکروبی 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, YA. Hannun, Nature, **529**, 2016, 43.
- [2] LA. Torre, F. Bray, RL. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. Jemal, CA Cancer J Clin, **65**, 2015, 87.
- [3] JP. 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] MS. Szymanski, RA. 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. Esfandiar, M. R. Ganjali, *Mikrochim Acta*, **186**, 2019, 137.
- [12] H. Hashemzadeh, A. Allahverdi, E. Peter, *Modares J Biotechnol*, **10**, 2019, 573.
- [13] J. Esfandyari, B. Shojaedin. Givi, M. Mozafarnia, H. Hashemzadeh, H. Naderimanesh, *Modaers J Biotechnol*, **10**, 2019, 581.
- [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, *Jsci IAU*, **17**, 2008, 1.
- [24] AJ. Julson, DF. Olis, *Applied catal B: Environmental*, **65**, 2006, 1.
- [25] M.Taran, M. Rad, M. Alavi, *Biolmpacts*, **8**, 2018, 81.
- [26] E. Babaei, A.R. Dehnad, N. Hajizadeh, H. Valizadeh , F. Reihani, *Applled 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.
- [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 pathogenes*, **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, Veronesi G, *Part Fibre Toxicol*, **11**, 2014, 13.
- [50] R. Movagharnia, F. Baghebani Arani, A. Sadat Shandiz, *Bi-monthly scientific research journal of Feyz*, **22**, 2019, 31.