



بررسی مقایسه‌ای تاثیر سه نوع نانوذره دی اکسید تیتانیوم در القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطان سینه T47-D و برهمکنش با DNA

| کوثر محسن پور^۱ | آزاده حکمت^{۱*} | سید محمد اطیابی^۲ | هاله بخشنده^۳

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور، تهران، ایران

۳- گروه نانوبیوتکنولوژی، گروه فناوری‌های نوین، انستیتو پاستور، تهران، ایران

چکیده: امروزه نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (TiO_2NPs) در صنایع نانوفناوری و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند و از طرق مختلف سنتز می‌شوند. هدف از این مطالعه، بررسی نقش پوشش سطح نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی D-47T و ایجاد تغییرات ساختاری در مولکول DNA می‌باشد. بررسی ثابت‌های اتصال نشان داد نانوذرات حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول ($2/2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) در مقایسه با دو نانوذرات دیگر ($2/3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) برای TiO_2NPs بدون پوشش ویژه و $1/1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ برای TiO_2NPs حاوی پایدارکننده (HNO_3)، می‌توانند برهم‌کنش قوی‌تری با DNA داشته باشند. نتایج طیف‌سنجی CD نشان داد در حضور هر سه نوع نانوذرات استکینگ بازهای DNA تغییر می‌یابد. با استفاده از آزمون MTT مقادیر 50-IC در حضور هر سه نوع نانوذرات محاسبه شد. نتایج رنگ آمیزی DAPI و تکنیک فلوسایتومتری نشان داد نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول با غلظت کمتری (63 میکرومولار= 50-IC) موجب القای مرگ سلولی بیشتری در سلول‌ها می‌شوند. نتایج این مطالعه بیانگر اهمیت پوشش سطح نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر مقدار برهمکنش آنها با DNA و همچنین، مقدار القای مرگ سلولی است. توجه به این نکته در طراحی نانوداروها برای درمان سرطان بسیار مهم است.

واژگان کلیدی: سلول‌های سرطان سینه T47-D، رنگ آمیزی DAPI، DNA، فلوسایتومتری، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم

*hekmat@ut.ac.ir

نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (TiO_2) به علت پایداری بالا، خاصیت فعال نوری و تمایل بالا به واکنش در گستره وسیعی از صنایع مرتبط با فناوری نانو کاربرد دارند [۲]. عنصر تیتانیوم یک فلز واسطه با چگالی کم، استحکام و درخشندگی بالا است. این عنصر در سال ۱۷۹۱ کشف و توسط مارتین کلاپروت تیتان (خدای خورشید، برگرفته از اساطیر یونانی) نام‌گذاری شد [۲-۴]. بیش از ۹۰ درصد تیتانیوم استخراج شده به صورت تیتانیوم دی اکسید

۱- مقدمه

گسترش فناوری نانو در دهه اخیر، موجب پیشرفت شگرفی در صنایع متفاوت شده است. نانوذرات به دلیل ویژگی‌های منحصر به فردشان از جمله افزایش نسبت سطح به حجم، زیست‌سازگاری و پایداری شیمیایی و زیستی بالا در صنایع دارویی، پزشکی و محیط زیست استفاده می‌شوند [۱]. از میان نانوذرات نیمه رسانا،

است. تیتانیوم دی اکسید که با نام‌های اکسید تیتانیوم IV یا تیتانیا نیز شناخته می‌شود هنگامی که به عنوان رنگدانه مورد استفاده قرار گیرد نام‌های تیتانیوم سفید یا رنگدانه سفید را به خود می‌گیرد [۲]. دی اکسید تیتانیوم در سه فاز اصلی بلورین روتیل (Rutile)، آناتاز (Anatase) و بروکیت (Brookite) وجود دارد. شبکه بلورین روتیل به صورت چهاروجهی است و دارای ثابت انکسار و قدرت پراش بالایی در میان دیگر فلزات است و نام خود را از واژه رتیلوس به معنای قرمز تیره برگرفته است. شبکه بلورین آناتاز نیز به صورت چهاروجهی بوده و به علت کشیدگی شبکه بلورین آن به آناتاز یا کشیده معروف است. برخلاف دو فاز پیشین، فاز بروکیت به صورت ارتومبیک بوده و فعالیت نوری ندارد و کمیاب‌ترین فاز بلورین TiO_2 به شماره می‌رود. از بین این سه فاز، فاز آناتاز زیست‌سازگاری بیشتری نسبت به فاز رتیل دارد [۲]. همه خصوصیات دی اکسید تیتانیوم در نانو TiO_2 وجود دارد با این تفاوت که اندازه آن بسیار کوچکتر است و به واسطه سطح تماس بیشتر قابلیت اثرگذاری بیشتری دارد [۳]. با توجه به مطالعات انجام شده به نظر می‌رسد، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم از طریق تولید رادیکال‌های آزاد اکتیوژن (ROS)، تخریب فعالیت میتوکندریایی سلول، برهمکنش با غشای سلول، پراکسید کردن لیپیدهای غشایی، آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری و تأثیر بر تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی موجب مرگ سلولی (آپوپتوز) می‌شوند [۳، ۵]. نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در پزشکی، دارورسانی (Drug Delivery)، فوتودینامیک تراپی (PDT) و تصویربرداری کامپیوتری از تومورها (CT) بسیار کاربرد دارند [۶]. تاکنون روش‌های متعددی برای سنتز نانوذرات دی اکسید تیتانیوم مورد استفاده قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به روش آبکافت، روش سل-ژل در حضور یک ماده‌ی فعال‌کننده سطحی، روش هیدروترمال تحت حرارت و فشار، روش سل-ژل بر روی یک بستر از جنس کربن فعال شده، روش مایکروویو آب-گرمایی، روش آب‌گرمایی به کمک امواج فراصوتی، روش مکانوشیمیایی، رسوبدهی شیمیایی و الکتروشیمیایی و روش پلاسمای حرارتی با فرکانس رادیویی اشاره کرد [۷]. پلی اتیلن گلیکول (PEG) یک بسپار پیچ خورده از تکرار واحدهای اتیلن اتر است. PEG دارای خواص فیزیوشیمیایی و زیستی مهمی همچون عدم سمیت و غیرایمنی‌زایی، سنتیک دارویی

(pharmacokinetics) مناسب و توزیع مناسب بافتی است [۸]. همچنین، دارای خاصیت آبدوستی بالایی است [۹]. اصلاح سطح نانوذرات با PEG نه تنها مانع از تجمع نانوذرات می‌شود، بلکه زیست‌سازگاری آنها را بهبود می‌بخشد و همچنین، زمان گردش نانومواد در درون بدن را افزایش می‌دهد [۱۰]. یافته‌ها نشان می‌دهد پوشش نانوذرات TiO_2 با PEG موجب کاهش مرگ سلولی و کاهش بیان ژن‌های مرتبط با استرس می‌شود [۱۱]. مقالات پیشین نشان داده است که القای مرگ سلولی توسط TiO_2 به نوع سلول و ساختار غشا آن وابسته است [۱۲]. پگیله شدن موجب عملکرد بهتر نانوداروها و در عین حال افزایش نفوذپذیری آنها در تومورها می‌شود [۱۳]. اسید نیتریک (HNO_3) نیز معمولاً جهت اصلاح سطح و ایجاد پایداری در سنتز نانوذرات به کار می‌رود و استفاده از HNO_3 می‌تواند موجب افزایش سطح و عملکرد بهتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم شود [۱۴].

عملکرد حیاتی اسیدهای نوکلئیک به ویژه DNA در فرآیندهای زیستی شناخته شده است. برهمکنش DNA با نانوذرات با توجه به اثرات احتمالی نانوذرات بر سنتز، همانندسازی و ساختار DNA در صنایع داروسازی و پزشکی بسیار حائز اهمیت است [۱۵]. از دیگر سو، مطالعه تأثیر اندازه، فاز بلورین و پوشش نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر مقدار مرگ سلولی نشان داده است نه تنها نوع فاز بلورین و اندازه نانوذرات بلکه نوع پوشش و شکل نانوذرات دی اکسید تیتانیوم نیز در مقدار مرگ سلولی تولید شده، کاهش رشد سلولی و در نهایت مرگ سلولی نقش کلیدی و مهمی را ایفا می‌نماید [۱۶]. پس، انجام مطالعاتی که تأثیر نوع پوشش نانوذرات را بر مقدار برهمکنش با DNA بررسی کند و همچنین مقدار ایجاد مرگ سلولی را در آنها مقایسه نماید، لازم و ضروری است. در این مطالعه به مقایسه تأثیر سه نوع نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (در فاز آناتاز) با ابعاد کمتر از ۱۰ نانومتر و سنتز شده به روش شیمیایی بر ساختار DNA با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی پرداخته شد. مقدار القای مرگ سلولی با نانوذرات بالا در سلول‌های سرطان سینه T47-D نیز مورد بررسی قرار گرفت. این رده سلولی جزو گروه Luminal A است و دارای گیرنده برای استروژن و پروژسترون است. در این گروه افزایش تولید HER2 عامل سرطانی شدن نیست. این سلول‌ها در نتیجه اختلال در عملکرد سلول‌های اپیتالیال سینه ایجاد می‌شود. این رده

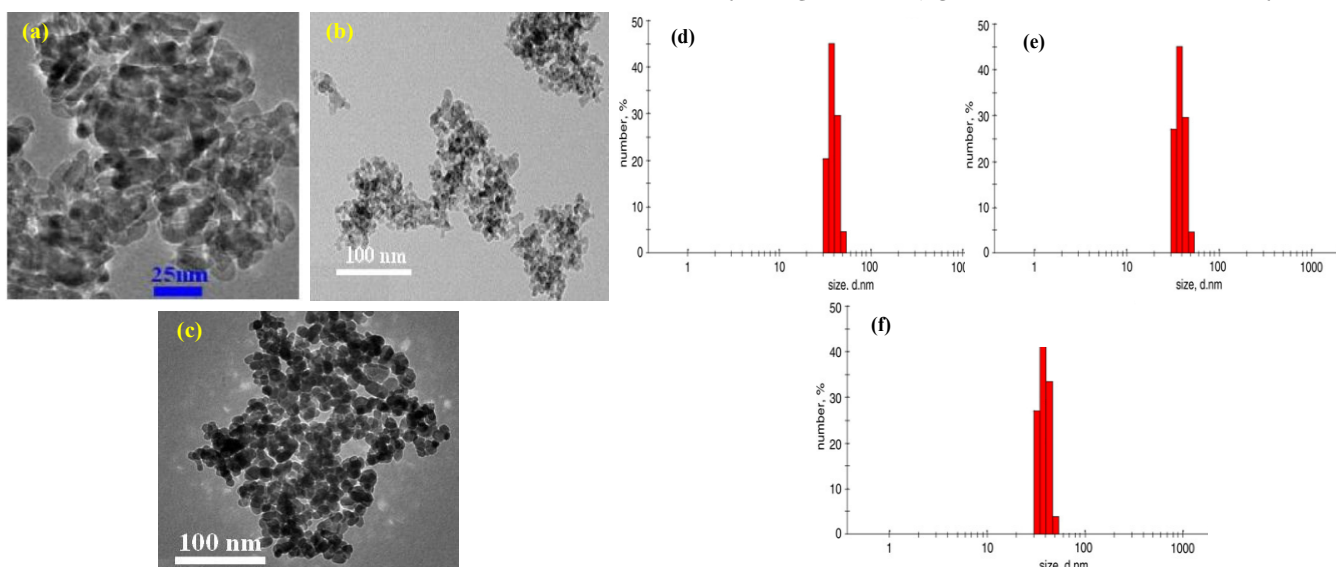
سنتز شده به روش شیمیایی و شماره تولید US7832) (شکل ۱) و f) از شرکت US Research Nanomaterials (آمریکا) خریداری شد. Tris hydroxymethyl aminomethane (Tris-base) و DNA Green Viewer به ترتیب از شرکت سیناژن (ایران) و شرکت پارس توس (ایران) خریداری شدند. تایید اندازه نانوذرات با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری پراکندگی نور پویا (DLS) انجام شد. تمام آزمایش‌های طیف‌سنجی در بافر Tris-base ۰/۱ مولار با pH ۷/۴ انجام شد. DAPI (4'-6) Trypsin-) (Diamidino-2-phenylindole)، (EDTA (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-، (MTT (diphenyl tetrazolium bromide)، پنی سیلین (Penicilin)، استرپتومایسین (Streptomycine) و DNA استخراج شده از تیموس گاو از شرکت سیگما آلدریج (آمریکا) خریداری شدند. محیط کشت RPMI1640 و سرم جنین گاوی (FCS: Fetal calf Serum) از شرکت Gibco-Invitrogen (آمریکا) خریداری شدند. کیت Annexin FITC و رنگ فلورسانس PI از شرکت IQ product (هلند) خریداری شدند. رده سلولی T47-D از انستیتو پاستور ایران خریداری شد.

سلولی شامل گیرنده‌های ۱۷- بتا استرادیول، دیگر استروئیدها و کلسی تونین است. در این سلول‌ها انکوژن WNT7B بیان می‌شود. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند اطلاعات مهم و کاربردی در طراحی نانوداروها در اختیار متخصصین قرار دهد و پژوهشگران را در انتخاب نانوذرات مناسب با توجه به هدف کاربردی آنان به ویژه در درمان سرطان یاری دهد.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد

نانوذرات دی اکسید تیتانیم فاز آناتاز (پودر سفید رنگ، سنتز شده به روش شیمیایی، با اندازه ۴-۸ نانومتر، دارای پایدارکننده HNO_3 ، سطح ویژه $140 \text{ m}^2/\text{g}$ ، قابل حل در آب به صورت محلول کلوئیدی شفاف، غیر قابل حل در محلول‌های غیرقطبی و شماره کاتالوگ PL-TiO-NO) (شکل a) و d) از شرکت PlasmaChem GmbH (آلمان) تهیه شد. نانوذرات دی اکسید تیتانیم فاز آناتاز (پودر، اندازه کمتر از ۱۰ نانومتر، ۹۹٪ خلوص، سطح ویژه $150 \text{ m}^2/\text{g}$ و سنتز شده به روش شیمیایی) (شکل b) و e) از شرکت نانو پارس لیما (ایران) خریدار شد. این نوع از نانوذرات پس از حل شدن در بافر تریس به مدت ۱۰ دقیقه سونیکه شدند. نانوذرات دی اکسید تیتانیم فاز آناتاز (محلول شفاف، اندازه کمتر از ۱۰ نانومتر، ۹۹٪ خلوص، سطح ویژه $150 \text{ m}^2/\text{g}$ ، کروی شکل، حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول،



شکل ۱: تصاویر TEM برگرفته از شرکت‌های سازنده نانوذرات دی اکسید تیتانیم حاوی پایدارکننده HNO_3 (a)، نانوذرات دی اکسید تیتانیم بدون پوشش ویژه (b) و نانوذرات دی اکسید تیتانیم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول (c) و طیف‌های DLS نانوذرات دی اکسید تیتانیم حاوی پایدارکننده HNO_3 (d)، نانوذرات دی اکسید تیتانیم بدون پوشش ویژه (e) و نانوذرات دی اکسید تیتانیم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول (f).

۲-۲- دستگاه‌ها

از پراکندگی نور پویا (DLS) Brookhaven Instruments Corporation (ساخت آمریکا)، الیزابدر، Model Expert 96، میکروسکوپ Asys Hitchech, Australia (ساخت استرالیا)، میکروسکوپ فلورسانس Axoscope 2 plus fluorescence microscopy (ساخت آلمان)، دستگاه فلوسایتومتری Flow cytometry, Partec PAS (ساخت آلمان)، اسپکتروفومتر فلورسانس مدل هیتاچی MPF-7 (ساخت آمریکا) و طیف‌سنج دورنگ‌نمایی دورانی Model 215, Aviv (ساخت آمریکا) استفاده شد.

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{(Ab_{ex} + Ab_{em})/2}$$

(۱)

در این معادله F_{corr} و F_{obs} بیانگر شدت نشر فلورسانس مشاهده شده و شدت نشر فلورسانس تصحیح شده است. Ab_{em} و Ab_{ex} نیز به ترتیب بیانگر جذب محلول در طول موج‌های تهیج و نشر است.

۲-۴- مطالعات طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی (CD)

برای مطالعه تغییرات ساختاری در DNA در حضور نانوذرات دی اکسید تیتانیم (بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO_3 و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول) طیف‌های CD با استفاده از طیف‌سنج دورنگ‌نمایی دورانی ثبت شد. ابتدا طیف CD نمونه DNA (۸/۳۲ میکرومولار) مورد بررسی قرار گرفت. سپس، طیف‌های CD پس از افزودن هر سه نوع نانوذرات دی اکسید تیتانیم (۱۹ میکرومولار، بیشینه غلظت بدست آمده از روش فلورسانس) در گستره طول موج ۲۲۰ تا ۳۲۰ نانومتر با استفاده از کووت کوارتز، طول مسیر ۰/۱ سانتی‌متر، رزولوشن ۰/۲ نانومتر و سرعت اسکن ۲۰ نانومتر در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ثبت شد. از آنجا که چرخش نوری توسط مولکول‌های مواد فعال ایجاد می‌شود، مقدار چرخش بستگی به تعداد مولکول‌هایی دارد که در مسیر نور قرار می‌گیرند. بنابراین مقدار چرخش، به طول مسیر عبور نور و غلظت محلول بستگی دارد [۶]. بدین علت نتایج بر حسب بیضی‌واری مولی ($deg\ cm^2\ dmol^{-1}$) ارائه شد.

۲-۵- کشت سلول‌ها

سلول‌های سرطان سینه T47-D در فلاسک‌های کشت سلول شامل محیط کشت RPMI محتوی L-glutamine (۲ mM)، FCS گرما داده شده (۱۰ درصد)، استرپتومایسین و آمپی‌سیلین ($5\ \mu g/ml$) کشت داده شد. سپس، در انکوباتور استریلیزه شده با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 نگهداری شدند.

۲-۶- تیمار سلول‌ها

۲-۳- مطالعات طیف‌سنجی نشر فلورسانس

اندازه‌گیری شدت نشر فلورسانس DNA، به منظور مطالعه تاثیر نوع پوشش انتخابی در هنگام سنتز نانوذرات دی اکسید تیتانیم در غلظت‌های متفاوت بر ساختار DNA مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که ماکرومولکول DNA دارای نشر فلورسانس ذاتی قابل ملاحظه‌ای نیست، از یک ماده فلوروفور (رنگ فلوروسنت) موسوم به DNA Green Viewer™ برای اندازه‌گیری تغییرات در نشر فلورسانس DNA استفاده شد. نشر فلورسانس با استفاده از طیف‌سنجی فلورسانس بررسی شد. برای کنترل دما در طی هر آزمایش، از حمام مدل Protherms NTB-211 استفاده شد. طول موج تحریک در تمام طول آزمایش‌ها ۴۹۰ نانومتر تنظیم شد. غلظت نمونه DNA مورد مطالعه ۸/۳۲ میکرومولار بود. ابتدا طیف فلورسانس نمونه DNA مورد بررسی قرار گرفت و سپس نشر فلورسانس نمونه DNA پس از افزودن غلظت‌های متفاوت (۳ تا ۱۹ میکرومولار) از نانوذرات دی اکسید تیتانیم (بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO_3 و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ثبت شد. ضخامت کووت‌های کوارتز در آزمایش‌ها ۱ سانتی‌متر و پهناي شکاف در تهیج و نشر به ترتیب ۱۰ و ۱۰ نانومتر تنظیم شد. از آنجا که جذب پرتو توسط خاموش کننده موجب کاهش سیگنال تهیج و نشر (فیلتراسیون داخلی) می‌شود. برای تصحیح اثر فیلتراسیون داخلی از معادله ۱ استفاده شد:

مطالعه بر OD گروه‌های کنترل (بدون هیچ گونه تیمار) تقسیم و نتیجه به صورت درصد کنترل بیان شد.

۸-۲- رنگ آمیزی سلول‌ها با DAPI

پس از پایان تیمار سلولی یک میلی‌گرم پودر DAPI در یک میلی‌لیتر آب دیونیزه استریل حل شد. پس از رسوب و شستشوی سلول‌ها با PBS ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سلولی تیمار نشده و تیمار شده با نانوذرات دی اکسید تیتانیم (بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO₃ و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO₃ و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول) با یک میکرولیتر از رنگ DAPI مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون روی لام میکروسکوپی قرار داده شد و اسمیر تهیه شد [۳]. سپس، بر آن لامل گذاشته و حداقل ۲۰۰ سلول با میکروسکوپ فلورسانس مورد شمارش قرار گرفت.

۹-۲- بررسی فرایند القاء آپوپتوز روش فلوسایتومتری

کیت فسفاتیدیل‌سرین شامل انکسین FITC-V، بافر کلسیم و رنگ فلورسانس PI روشی سریع و مطمئن در تشخیص فرایند مرگ آپوپتوزی سلول‌ها است. سلول‌های سرطانی T47-D (۲×۱۰^۵ میلی‌لیتر/سلول) به مدت ۴۸ ساعت با نانوذرات دی اکسید تیتانیم (بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO₃ و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول) انکوبه شدند و سپس سلول‌ها با کیت فسفاتیدیل‌سرین و به روش فلوسایتومتری بررسی شدند. بدین منظور بعد از پایان زمان انکوباسیون سلول‌ها دوبار با PBS سرد شسته شدند و بلافاصله به بافر اتصالی (binding buffer) منتقل شدند. سپس، حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتری سوسپانسیون سلولی به لوله‌های ۵ میلی‌لیتری ویژه انتقال یافت. به هر کدام از لوله‌های مذکور ۵ میکرولیتر از محلول انکسین V کونژوگه با FITC افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از پایان انکوباسیون ۱۵ دقیقه‌ای، سلول‌ها با بافر اتصالی X ۱ دو بار شسته شده و در نهایت به ۱۰۰ میکرولیتر از همین بافر منتقل شدند. به ۱۰۰

ابتدا سلول‌های سرطان سینه T47-D در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای (با تعداد سلول ۲×۱۰^۴ سلول به ازای هر چاهک)، در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO₂ و رطوبت کافی کشت داده شدند. سپس، غلظت‌های متفاوت (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) از نانوذرات دی اکسید تیتانیم (بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO₃ و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول) که پیشتر فیلتر شده بودند به آنها افزوده شد. پس از ۴۸ فعالیت تکثیر سلولی بررسی شد.

۷-۲- سنجش فعالیت تکثیر سلولی با آزمون MTT

با استفاده از روش رنگ سنجی MTT تعداد سلول‌های زنده تیمار شده و تیمار نشده با غلظت‌های متفاوت از نانو ذرات دی اکسید تیتانیم (بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO₃ و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول) پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون سنجش شد. در ابتدا پودر MTT در بافر PBS حل شد و غلظت نهایی آن ۵ mg/ml بدست آمد. سپس محلول MTT به منظور حذف ذرات نامحلول احتمالی که در برخی نمونه‌های MTT وجود دارد، از خلال فیلتر ۰/۵ میکرومولار فیلتر شد. به هر کدام از چاهک‌ها ۲۵ میکرولیتر محلول MTT افزوده شد و سپس سلول‌ها به مدت چهار ساعت انکوبه شدند. MTT محلول و زرد رنگ، با شکست حلقه تترازولیم آن با آنزیم‌های دهیدروژناز، به فورمازان (formazan) نامحلول و بنفش تبدیل می‌شود. در واقع آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی سلول زنده و فعال قادر به تبدیل MTT به فورمازان است. اما سلول‌های مرده از این نظر ناتوان هستند. بنابراین واکنش تبدیل MTT به فورمازان، یکی از روش‌های مهم و مطرح در سنجش فرایند تکثیر سلولی است [۱۷]. جهت سنجش نوری فورمازان لازم است آن را به صورت محلول درآورد. به همین دلیل در پایان انکوباسیون به هر کدام از چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر از محلولی شامل SDS (۱۰٪) و دی متیل فورامید (DMF) (۵۰٪) افزوده و پلیت‌ها برای مدت دو ساعت در شرایطی مشابه با شرایط کشت سلولی نگهداری شدند. سپس پلیت‌ها با فویل آلومینیومی پوشانده شد و جهت ظاهر شدن رنگ به مدت ۱۰ دقیقه بر شیکر قرار گرفت. سپس دانسیته نوری محلول درون هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط الایزاریدر سنجیده شد. جذب یا چگالی نوری (OD) تابعی از MTT تبدیل شده به فورمازان است. مقادیر OD گروه‌های مورد

میکرولیتر سوسپانسیون سلولی در بافر اتصالی، ۵ میکرولیتر محلول PI افزوده شده و سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۵ دقیقه دیگر در شرایط دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد [۳]. به هر کدام از لوله‌ها، در پایان انکوباسیون، ۴۰۰ میکرولیتر بافر اتصالی افزوده شد و بلافاصله سلول‌ها با دستگاه فلوسایتومتری بررسی شدند. کانال‌های FL1 و FL2 به ترتیب جهت ردیابی انکسین-FITC و PI مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۱۰- بررسی آماری داده‌ها

برای بررسی معنی‌دار بودن آماری داده‌ها از روش One way analysis of ANOVA استفاده شد (نرم افزار SPSS ورژن ۱۶) و تغییرات با $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

۳-۱- بررسی نشر فلورسانس

از آنجا که طیف‌سنجی فلورسانس یک روش بسیار قوی برای مطالعه ساختار دو رشته‌ای DNA است، با کمک روش فلورسانس عارضی (extrinsic fluorescence) مطالعات تأثیر هر سه نوع نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر روی DNA انجام یافت. شکل ۲ نشر نمونه حاوی DNA همراه با فلور DNA Green Viewer پس از افزودن نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO_3 و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول را نشان می‌دهد. همانگونه که مشاهده می‌شود، مقدار نشر فلورسانس DNA+DNA Green Viewer در بیشینه نشر فلورسانس (λ_{max}) در ۵۳۰ نانومتر پس از تیتراسیون هر سه نوع نانوذرات کاهش یافت و به عبارت دیگر پدیده خاموشی نشر فلورسانس (quenching fluorescence) رخ داد [۱۸]. با توجه به مشاهده خاموشی نشر فلورسانس پس از افزودن نانوذرات، در مرحله بعدی پارامترهای اتصال نانوذرات به DNA محاسبه شد.

۳-۲- تعیین پارامترهای اتصال

هنگامی که مولکول‌های تحریر شده حضور داشته باشند بسیاری از اتفاقات بین مولکول و محیط (حلال) روی می‌دهد که موجب تغییر در نشر فلورسانس می‌شود. با آنالیز این تغییرات می‌توان اطلاعاتی درباره تأثیر برخورد مولکول تحریر شده با

محیط اطراف بدست آورد. در نتیجه این برخوردها، زمان فلورسانس کاهش یافته و موجب ایجاد فرایند اضافی در پخش مولکول‌های تحریر شده می‌شود. همانگونه که پیشتر ذکر شد، به کاهش در شدت نشر فلورسانس پدیده فرونشانی یا خاموشی گفته می‌شود [۱۸]. افزودن خاموش‌کننده (quencher) به محیط نیز به طریقی همین کار مولکولی را انجام می‌دهد، سرعت خاموش‌شوندگی بستگی به ضریب سرعت و غلظت خاموش‌کننده دارد. معمولاً درجه سرعت از نوع نخست کاذب است. طبق گزارشات عوامل متعددی سبب کاهش شدت فلورسانس می‌شود که از آن جمله، انتقال انرژی، انتقال بار، برخورد مولکول‌ها و یا ایجاد کمپلکس در حالت پایه را می‌توان نام برد. از آنجا که خاموشی نشر فلورسانس پس از تیتراسیون نانوذرات به DNA مشاهده شد. برای یافتن پارامترها و مکانیسم دخیل در پدیده خاموشی از معادله استرن-ولمر استفاده شد (معادله ۲) [۱۹، ۲۰]. خاموشی دینامیک زمانی اتفاق می‌افتد که یک اتم یا مولکول با فلوروفور در حالت تهیج، برخورد نموده و سبب بازگشت فلوروفور به حالت پایه، بدون انتشار شود. پدیده خاموشی استاتیک زمانی اتفاق می‌افتد که فلوروفور با مولکول دیگری کمپلکس ایجاد نماید و بازگشت به حالت پایه برای فلوروفور فاقد هرگونه انتشار باشد [۱۹، ۲۰].

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (2)$$

در معادله بالا F_0 و F به ترتیب بیانگر نشر فلورسانس DNA در غیاب و حضور هر سه نوع نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم است. K_{SV} ثابت استرن-ولمر و $[Q]$ غلظت کل خاموش‌کننده (نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم) است.

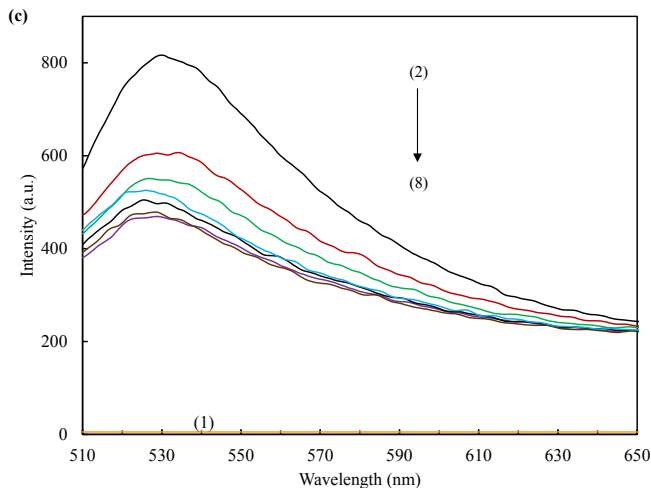
شکل ۳ نمودار استرن-ولمر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بدون پوشش، حاوی پایدارکننده HNO_3 و حل شده در ماتریکس

پراکنده اتیلن گلیکول را نشان می‌دهد. به طور معمول نمودار $\frac{F_0}{F}$

در مقابل $[Q]$ به صورت خطی با شیب K_{SV} است. اما در برخی از موارد پدیده خاموشی ترکیبی از حالت دینامیک و استاتیک

است که در این حالت نمودار $\frac{F_0}{F}$ در مقابل $[Q]$ به صورت

منحنی صعودی است. همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود



شکل ۲: تغییرات در نشر DNA با افزایش غلظت (a) نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدون پوشش ویژه، (b) نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده HNO_3 و (c) نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد. (۱) نشر DNA، (۲) نشر DNA+DNA Green Viewer و (۳-۸) خاموشی نشر پس از افزودن ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵ و ۱۹ میکرومولار نانوذرات دی اکسید تیتانیوم. این بررسی سه بار به صورت مستقل انجام شد.

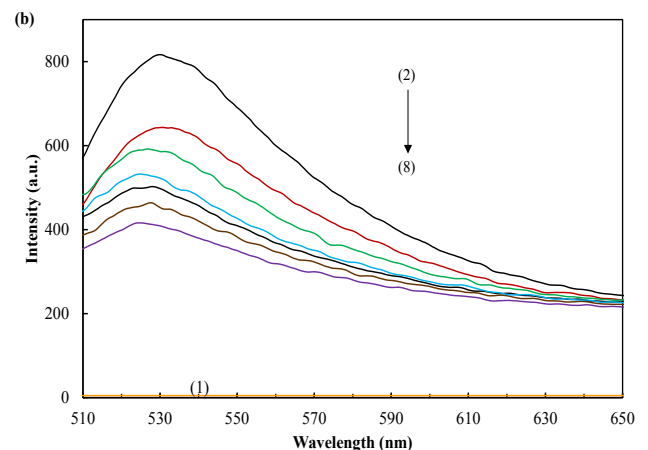
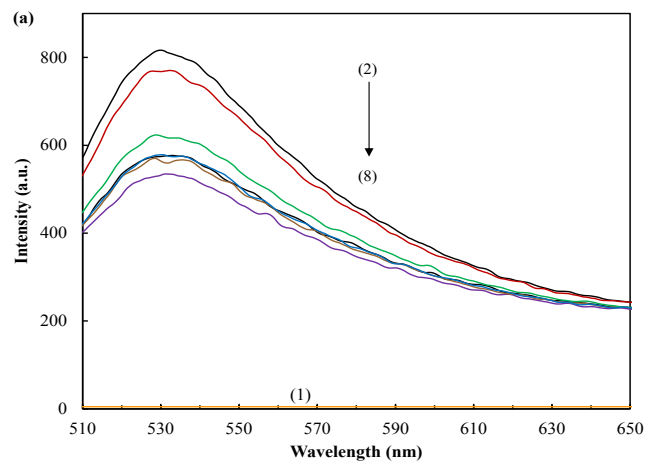
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad (4)$$

در رابطه بالا R ثابت عمومی گازها و T دمای مطلق است. مقادیر ΔG° محاسبه شده در جدول ۱ مرتب شده‌اند.

نمودارهای استرن-ولمر برای هر سه نوع نانوذرات دی اکسید تیتانیوم به صورت انحراف مثبت از خط راست به دست آمده است. به عبارت دیگر، اتصال نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدون پوشش، حاوی پایدارکننده HNO_3 و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول به DNA موجب خاموشی فلوروفور می‌شود و در این پدیده سهم تشکیل کمپلکس غیر فلورسانس (خاموشی استاتیک) بیش از خاموشی دینامیک است. در مرحله بعد پارامترهای اتصال در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد با استفاده از رابطه مدیفای شده استرن ولمر (معادله ۳) تعیین شدند [۱۹].

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (3)$$

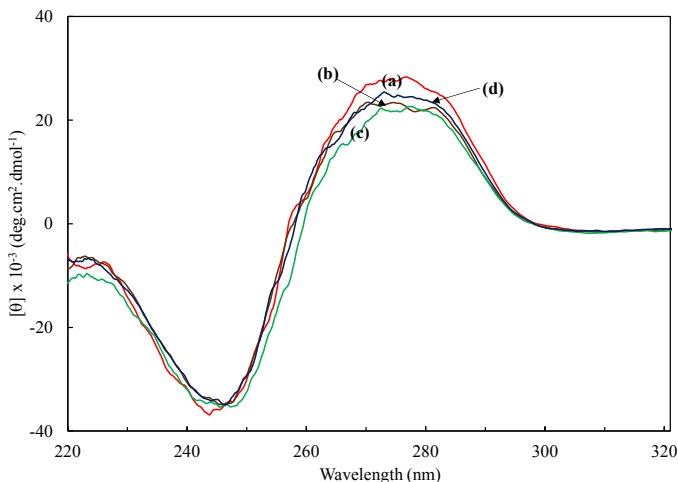
در معادله بالا K_b ثابت اتصال کمپلکس ایجاد شده بین نانوذرات DNA و n تعداد لیگاندهای اتصال (نانوذرات متصل شده) است که تعیین این پارامتر برای شناخت تعداد جایگاه‌های پیوندی مفید است. سپس با استفاده از ثابت‌های اتصال بدست آمده و معادله ۴ مقدار انرژی آزاد گیبس (ΔG°) اتصال نانوذرات دی اکسید تیتانیوم به DNA محاسبه شد [۱۸].



ایجاد شده در ساختار DNA پس از افزودن نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO_3 و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول بررسی شد (شکل ۴). طیف CD نمونه DNA دارای دو بیشینه جذب در طول موجهای ۲۴۵ و ۲۷۵ نانومتر است. همانگونه که مشاهده می شود پس از افزودن هر سه نوع نانوذرات تغییر در بیشینه های جذب مشاهده می شود و تغییر در قله مثبت (۲۷۵ نانومتر) بسیار شاخص تر از قله منفی (۲۴۵ نانومتر) است که بیانگر تغییرات ساختاری در DNA است.

جدول ۱: پارامترهای ترمودینامیکی و اتصال نانوذرات دی اکسید تیتانیوم متصل شده به DNA در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد

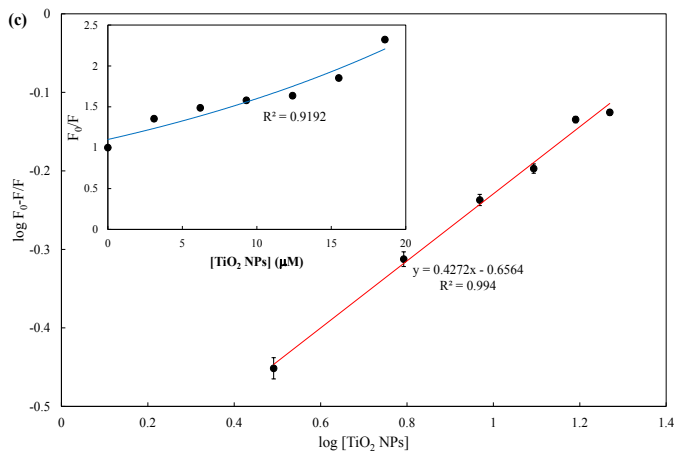
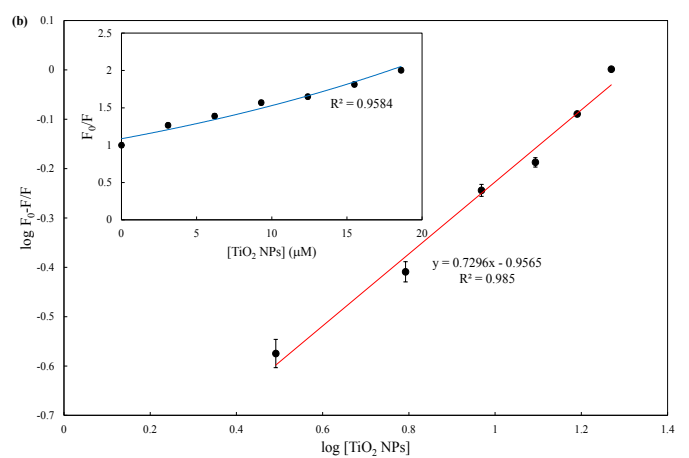
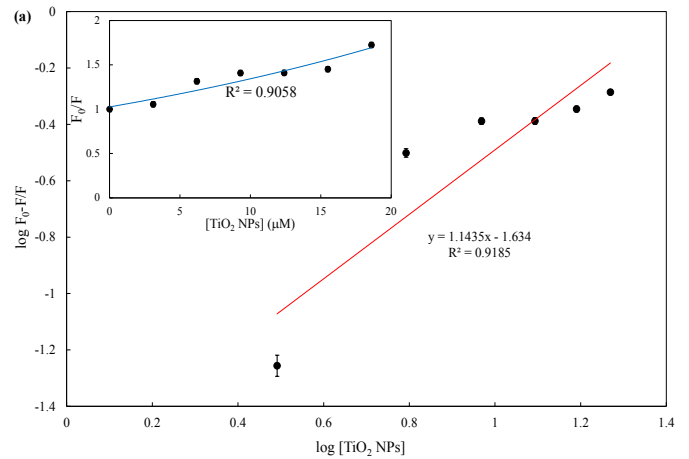
	$K_b (M^{-1})$	n	$\Delta G^\circ (kJ mol^{-1})$
نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدون پوشش ویژه	2.3×10^4	۱/۱	-۲۶/۰
نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده HNO_3	1.1×10^5	۰/۷	-۲۹/۹
نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول	2.2×10^5	۰/۶	-۳۱/۷



شکل ۴: طیف CD مربوط به DNA در غیاب (a) و حضور نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدون پوشش ویژه (b)، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده HNO_3 (c) و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول (d) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (این بررسی سه بار به صورت مستقل انجام شد).

۳-۴ نتایج سنجش فعالیت تکثیر سلولی با آزمون MTT

تعداد نسبی سلول های تیمار نشده و تیمار شده در حضور غلظت های متفاوت از نانوذرات تیتانیوم (بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO_3 و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول) پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون به روش رنگ سنجی

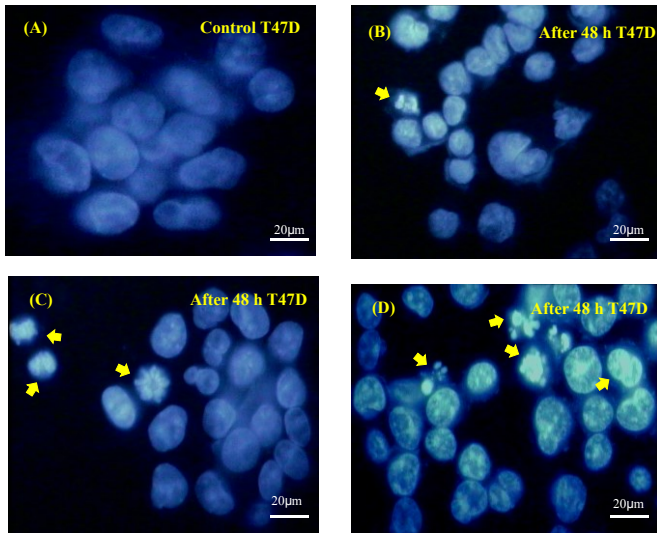


شکل ۳: نمودارهای مدیفای شده استرن-ولمر: نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدون پوشش ویژه (a)، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده HNO_3 (b) و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول (c) متصل شده به DNA در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد. نمودارهای الحاقی: نمودار F_0/F در مقابل غلظت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم.

۳-۳ نتایج طیف سنجی دورنگ نمای دورانی

از آنجا که طیف سنجی CD، درباره تغییرات ساختاری DNA در نتیجه تغییر شرایط آزمایش مانند دما و اتصال لیگاند اطلاعات بسیار مفیدی را ارائه می دهد، در این بخش از مطالعه تغییرات

میشود مقدار قطعه قطعه شدن هسته در حضور نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول بیشتر از دو نوع دیگر است. غلظت ۶۳ میکرومولار انتخابی معادل با کمترین IC50 بدست آمده برای نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول است.

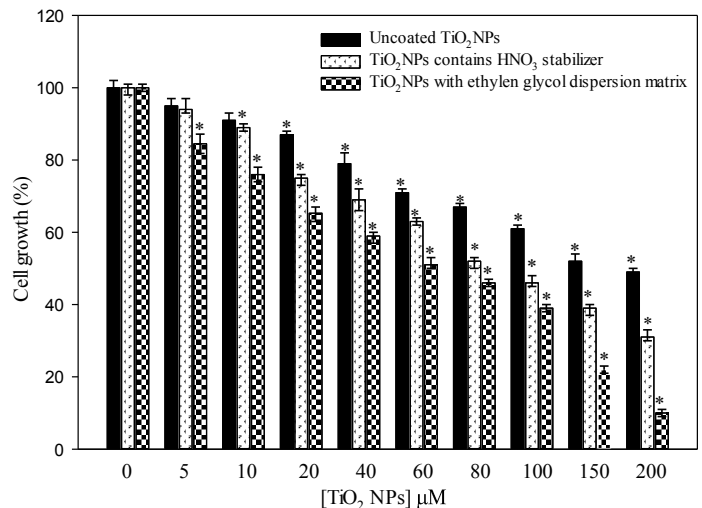


شکل ۶: تصاویر میکروسکوپ فلورسانس رنگ آمیزی DAPI برای سلول‌های T47-D. سلول‌های تیمار نشده (A) و سلول‌های تیمار شده با: نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدون پوشش ویژه (B)، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده حاوی HNO₃ (C) و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول (D) به مدت ۴۸ ساعت. غلظت نانوذرات ۶۳ میکرومولار است.

۳-۶- نتایج وقوع آپوپتوز با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری

برای تعیین درصد سلول‌هایی که در حضور نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO₃ و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول) دچار آپوپتوز شده‌اند، مطالعات فلوسایتومتری انجام گرفت. همانگونه که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، در حضور ۶۳ میکرومولار نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول، تعداد سلول‌های زنده کاهش چشمگیر یافته و درصد سلول‌های آپوپتوزی افزایش می‌یابد. این در حالی است که درصد سلول‌های نکروزه بسیار اندک و قابل چشم‌پوشی است.

MTT سنجش شد. منحنی‌های مهار رشد سلول‌های سرطانی سینه T47-D مهار وابسته به غلظت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم را نشان می‌دهند. همانگونه که شکل ۵ نشان می‌دهد رشد سلول‌ها با افزایش غلظت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول کاهش چشمگیر یافت ($P < 0.05$). اما سلول‌ها نسبت به نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدون پوشش ویژه و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده HNO₃ مقاوم‌تر بودند. مقادیر IC₅₀ یا غلظتی از نانوذرات بالا که ایجاد ۵۰٪ سمیت یا مرگ و میر در سلول‌های سرطان سینه T47-D می‌کند، محاسبه شد. این مقادیر برای نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدون پوشش ویژه، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده HNO₃ و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول به ترتیب ۱۹۵ میکرومولار، ۸۵ میکرومولار و ۶۳ میکرومولار بدست آمد.



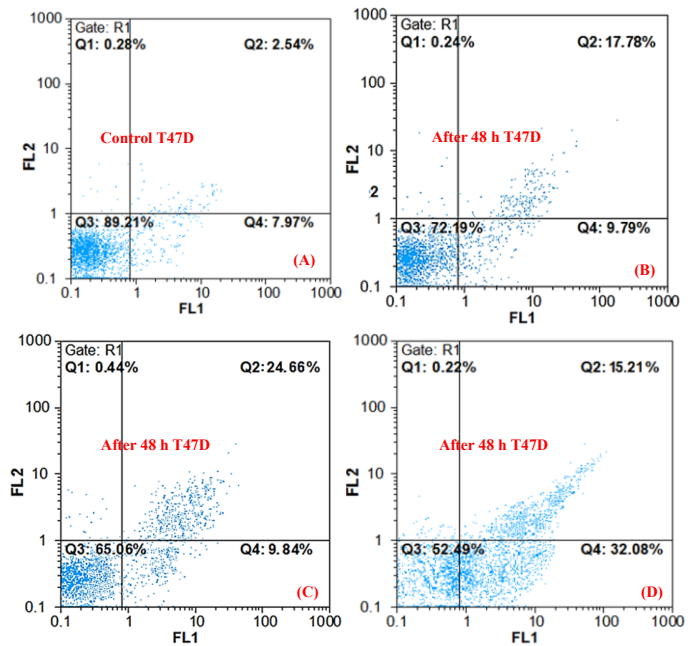
شکل ۵: نتایج حاصل از تست MTT پس از ۴۸ ساعت. تاثیر مهاری غلظت‌های متفاوت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO₃ و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول) بر سلول‌های T47D. نتایج میانگین ۵ آزمایش مستقل \pm SD است. $P < 0.05$ در مقایسه با سلول‌های بدون تیمار است.

۳-۵- نتایج بررسی سلول‌ها با استفاده از رنگ آمیزی DAPI

همانگونه که در شکل ۶ نشان داده شده است، سلول‌های تیمار نشده (کنترل) دارای هسته گرد و آبی کم رنگ هستند. در حالی که افزودن ۶۳ میکرومولار از نانوذرات تیتانیوم دی اکسید (بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO₃ و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول) موجب ایجاد هسته‌های تکه تکه شده و درخشان در رده سلولی T47-D میشود. همانگونه که مشاهده

کوچک با DNA است [۱۹]. همانگونه که در شکل ۲ مشاهده شد با افزایش غلظت هر سه نوع نانوذرات دی اکسید تیتانیم (بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO₃ و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول) خاموشی در نشر بیشینه فلورسانس DNA-DNA Green Viewer™ مشاهده شد. بنابراین، می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که بین نانوذرات دی اکسید تیتانیم و DNA کمپلکس ایجاد شده است. زیرا بر طبق مطالعات منتشر شده، هرگاه لیگاند دومی در حال رقابت با لیگاند اول برای اتصال به جایگاه اتصال DNA باشد کاهش در شدت نشر فلورسانس یا خاموشی نشر (quenching) ایجاد می‌شود [۱۹، ۲۰]. Patel و همکارانش [۲۱] نیز هنگامیکه نانوذرات دی اکسید تیتانیم را به DNA در حضور اتیدیم برمایید (به عنوان ماده فلورسانس عارضی) افزودند و نتیجه مشابهی را مشاهده کردند. رهبان و همکارانش [۲۲] در مطالعه‌ای به بررسی برهمکنش بین نانوذرات نقره و DNA تیموس گاوی توسط طیف‌سنجی فلورسانس پرداختند و مشاهده کردند نشر فلورسانس DNA در حضور اتیدیم برمایید با افزایش غلظت نانوذرات نقره، کاهش قابل توجهی می‌یابد و بیان کردند که بین نانوذرات نقره و DNA کمپلکس ایجاد شده است. مطالعات فلورسانس کمپلکس Zn(II)-ایوبوروفن با DNA نیز حاکی از کاهش نشر بیشینه فلورسانس DNA بود و بیان شد که بین روی-ایوبوروفن با DNA کمپلکس ایجاد شده است [۲۳]. بررسی پیوند Zn(II) با DNA با مطالعات فلورسانس نیز نشان داد که شدت نشر فلورسانس DNA در حضور غلظت بالایی از Zn(II) کاهش می‌یابد و اینگونه نتیجه‌گیری شد که این کاهش نشر نشان دهنده اتصال قوی بین DNA و Zn(II) است [۲۴].

شدت نشر فلورسانس یک ترکیب می‌تواند تحت تأثیر انواع برهمکنش‌ها شامل برهمکنش‌های حالت تحریک شده (Excited state)، آرایش دوباره مولکولی، انتقال انرژی، ایجاد کمپلکس‌های حالت پایه (Ground state) و خاموشی تصادفی (Collisional quenching) کاهش یابد [۲۰]. بنابراین جهت یافتن مکانسیم دخیل در پدیده خاموشی از معادله استرن-ولمر استفاده شد. همانگونه که در شکل ۳ مشاهده شد، نمودارهای استرن-ولمر برای هر سه نوع نانوذرات دی اکسید تیتانیم (بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO₃ و حل شده در ماتریکس



شکل ۷: نمودار حاصل از فلورسایتمتری Annexin V-PI برای سلول‌های T47D. سلول‌های تیمار نشده (A) و سلول‌های تیمار شده با: نانوذرات دی اکسید تیتانیم بدون پوشش ویژه (B)، نانوذرات دی اکسید تیتانیم حاوی پایدارکننده HNO₃ و نانوذرات دی اکسید تیتانیم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول (C) به مدت ۴۸ ساعت. این بررسی سه بار به صورت مستقل انجام شد. غلظت نانوذرات ۶۳ میکرومولار است.

۴- بحث

یکی از ارکان مهم و کاربردی در استفاده از نانوذرات، روش سنتز و خصوصیات شیمی-فیزیکی آنها است. پوشش یا اصلاح سطح نانوذرات توسط عوامل شیمیایی گوناگون می‌تواند موجب تغییر در خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، مقدار پایداری، مقدار سمیت و حتی عملکرد نانوذرات شود. برهمکنش نانوذرات با DNA (به عنوان یک ماکرومولکول حیاتی) با توجه به اثرات احتمالی آنها بر سنتز، همانند سازی و ساختاری DNA توجه دانشمندان را به خود جلب کرده است [۱۵]. همچنین، مقدار القای مرگ سلولی توسط نانوذرات جهت طراحی و ساخت نانوداروها بسیار مهم و حیاتی است. پس، در این مطالعه با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی فلورسانس و طیف‌سنجی CD به بررسی تأثیر نوع پوشش نانوذرات دی اکسید تیتانیم با اندازه و فاز یکسان بر ساختار DNA در شرایط *in vitro* پرداخته شد. پس از آن تأثیر نوع پوشش نانوذرات دی اکسید تیتانیم بر مقدار القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطان سینه T47-D بررسی شد.

طیف‌سنجی فلورسانس یکی از روش‌های دقیق و قابل اعتماد برای مطالعه تغییرات ساختاری حاصل از برهمکنش مولکول‌های

تقریباً $-37/7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($-8/99 \text{ kcal mol}^{-1}$) بدست آوردند که به مقدار ΔG° بدست آمده برای نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول در مطالعه حاضر بسیار نزدیک است.

طیف‌سنجی CD، در مورد تغییرات ساختاری DNA در هنگام اتصال لیگاند و یا تغییرات دمایی اطلاعات بسیار مفیدی را ارائه می‌دهد [۲۸]. طیف CD برای ماکرومولکول DNA در گستره طول موج ۲۲۰ تا ۳۲۰ نانومتر در عدم حضور و حضور نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO_3 و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول) بررسی شد. همانگونه که در شکل ۴ مشاهده شد، DNA دارای دو بیشینه جذب در طول موج‌های ۲۴۵ و ۲۷۵ نانومتر است که بر طبق مقالات، به ترتیب مربوط به راستگردی و استکینگ (انباشت) بازهای DNA است [۲۸]. در حضور نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدون پوشش ویژه، راستگردی تغییر شاخصی نمی‌کند اما استکینگ بازهای DNA کاهش می‌یابد. این امر در مورد نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده HNO_3 و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول نیز مشاهده می‌شود. همانگونه که مشاهده می‌شود تغییر در قله مثبت (۲۷۵ نانومتر) بسیار شاخص‌تر از قله منفی (۲۴۵ نانومتر) است. این نتایج بیانگر اتصال نانوذرات دی اکسید تیتانیوم از طریق اتصال به شیارهای DNA است [۲۹]. قابل ذکر است که مقدار تغییر در راستگردی در حضور نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده HNO_3 کمی بیشتر از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول است. Li و همکاران [۳۰] پس از افزودن نانوذرات دی اکسید تیتانیوم تهیه شده به روش هیدرولیز کنترل شده با عامل کاهنده hydroxypropylmethylcellulose به DNA کاهش در مقدار بیضی‌واری (θ) در قله مثبت و منفی مشاهده کردند که با نتایج بدست آمده حاضر تطابق دارد. Shahabadi و همکاران [۲۴] نیز پس از افزودن کمپلکس Zn(II)-ایوبروفن به DNA کاهش شاخص در قله مثبت و کاهش اندک در قله منفی طیف CD مشاهده و بیان کردند که کمپلکس Zn(II)-ایوبروفن از طریق غیر ایترکلشین (عدم قرارگیری بین بازهای آلی) و با اتصال به شیارهای DNA موجب تغییر ساختار DNA می‌شوند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت هر سه نوع نانوذرات دی اکسید

پراکنده اتیلن گلیکول) به صورت انحراف مثبت از خط راست بدست آمد. بنابراین در پدیده خاموشی نشر فلورسانس، سهم تشکیل کمپلکس غیر فلورسانس (خاموشی استاتیک) بیش از خاموشی دینامیک است [۲۵]. به عبارت دیگر اتصال هر سه نوع نانوذرات دی اکسید تیتانیوم به DNA از نوع استاتیک و تشکیل کمپلکس است. این نتایج با مشاهدات Patel و همکاران [۲۱] مبنی بر خاموشی نشر فلورسانس DNA از نوع استاتیک پس از افزودن نانوذرات دی اکسید تیتانیوم کاملاً تطابق دارد.

از آنجا که خاموشی نشر فلورسانس برای هر سه نوع نانوذرات دی اکسید تیتانیوم از نوع استاتیک تشخیص داده شد، پارامترهای اتصال با استفاده از رابطه مدیفای شده استرن-ولمر تعیین شدند. مقادیر n و ثابت اتصال هر سه نوع نانوذرات دی اکسید تیتانیوم به مولکول DNA متفاوت بوده و مقدار ثابت اتصال برای نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول ($M^{-1} \times 10^5$) بیشتر از دو نوع نانو ذره دی اکسید تیتانیوم دیگر ($M^{-1} \times 10^4$) برای نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدون پوشش ویژه و $M^{-1} \times 10^5$ برای نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده HNO_3) بدست آمد. به عبارت دیگر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول تمایل بیشتری به اتصال با DNA نسبت به نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده HNO_3 و نانوذرات بدون پوشش ویژه دارند. برطبق جدول ۱ استوکیومتری اتصال (n) برای هر سه نوع نانوذرات دی اکسید تیتانیوم تقریباً ۱ بدست آمد. Patel و همکاران [۲۱] نیز استوکیومتری اتصال برای هر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (با اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر) را تقریباً ۱ بدست آوردند. برطبق جدول ۱ مقدار ΔG° اتصال برای هر سه نوع نانوذرات دی اکسید تیتانیوم منفی بدست آمد که بیانگر خودبخودی بودن فرایند اتصال هر سه نوع نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با DNA است [۲۶، ۲۱]. همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، مقدار ΔG° برای نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول ($-37/7 \text{ kJ mol}^{-1}$) نسبت به دو نانوذره دی اکسید تیتانیوم دیگر بیشتر است، که دلیل بر ایجاد کمپلکس قوی‌تر این نوع نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با DNA است [۲۷]. Patel و همکاران [۲۱] مقدار ΔG° برای نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (با اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر) را

نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدون پوشش ویژه و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده HNO_3 به ترتیب ۳۰٪ و ۳۹٪ مرگ سلولی مشاهده می‌شود.

DAPI فلوری است که به DNA متصل می‌شود و با خاصیت فلورسانسی که دارد می‌توان رنگ حاصل از آن را در زیر میکروسکوپ فلورسانس مشاهده نمود. با توجه به این که جایگاه قرارگیری DNA در داخل هسته است، با رنگ‌آمیزی سلول‌ها با این رنگ می‌توان ریخت‌شناسی هسته را در زیر میکروسکوپ بررسی نمود. در سلول‌های کنترل و سالم معمولاً هسته به صورت گرد دیده می‌شود. اما در سلول‌های آپوپتوز شده با توجه به اینکه هسته متراکم و تکه تکه می‌شود، هسته در زیر میکروسکوپ به صورت تکه‌های پر رنگ دیده می‌شود [۳، ۳۱]. همانگونه که در شکل ۶ نشان داده شده است، سلول‌های تیمار نشده (کنترل) در رده سرطانی سینه T47-D دارای هسته گرد و آبی کم رنگ هستند. در حالی که افزودن ۶۳ میکرومولار از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول موجب ایجاد هسته‌های تکه تکه شده و درخشان شد. این در حالی است که مقدار قطعه قطعه شدن هسته در حضور ۶۳ میکرومولار نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدون پوشش ویژه و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده HNO_3 در این رده سلولی اندک است. بنابراین، می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که با غلظت کمتری (۶۳ میکرومولار) از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول القای آپوپتوز و مرگ سلولی بیشتری در سلول‌های T47-D مشاهده می‌شود. این مشاهدات با نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی MTT مطابقت دارد.

جهت تعیین مکانیسم مرگ سلولی در سلول‌های T47-D در حضور نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO_3 و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول) مطالعات فلوسایتومتري انجام گرفت. فلوسایتومتري روش دستگاہی بسیار سریع و قدرتمندی است که جهت شناسایی سلول‌ها و بررسی خصوصیات آنها به کار می‌رود. اغلب حجم مورد نیاز از نمونه مورد آزمایش بسیار کم و حدود ۱۰۰ میکرولیتر است. این روش بر خصوصیات پراکنده‌سازی نور توسط سلول‌ها و نیز بر نشر فلورسانس از آنها استوار است. نشر فلورسانس می‌تواند با استفاده مستقیم از مواد رنگ‌کننده فلورسنت یا ترکیبی از رنگ

تیتانیوم نیز به صورت غیر اینترکلیشین به DNA متصل می‌شوند. در مرحله بعد تاثیر پوشش شیمیایی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر مقدار القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطان سینه T47-D بررسی شد. تعداد نسبی سلول‌های تیمار نشده و تیمار شده در حضور غلظت‌های متفاوت از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (بدون پوشش ویژه، حاوی پایدارکننده HNO_3 و حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول) پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون به روش رنگ سنجی MTT که بوسیله موزمان [۱۷] توصیف شده است، سنجش شد. MTT محلولی زرد رنگ است و با شکست حلقه تترازولیم آن توسط آنزیم‌های دهیدروژناز سلول‌ها، به فورمازان نامحلول و بنفش تبدیل می‌شود. در واقع آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی سلول زنده و فعال قادر به تبدیل MTT به فورمازان است. اما سلول‌های مرده از این نظر ناتوان هستند. بنابراین واکنش تبدیل MTT به فورمازان، یکی از روش‌های مهم و مطرح در سنجش فرایند تکثیر سلولی است. همانگونه که شکل ۵ نشان داده شد، رشد سلول‌ها با افزایش غلظت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول کاهش چشمگیر می‌یابد ($P < 0.05$). از طرفی منحنی‌های مهار رشد سلول‌های سرطانی سینه T47-D مهار وابسته به غلظت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم را نشان می‌دهند. همانگونه که مشاهده می‌شود سلول‌های سرطانی T47-D نسبت به نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدون پوشش ویژه و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده HNO_3 مقاوم‌تر هستند. در مرحله بعد مقادیر IC_{50} یا غلظتی از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم که ۵۰٪ سمیت یا مرگ و میر در سلول‌ها ایجاد می‌کنند، محاسبه شد. این مقادیر برای نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدون پوشش ویژه، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده HNO_3 و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول به ترتیب ۱۹۵ میکرومولار، ۸۵ میکرومولار و ۶۳ میکرومولار بدست آمد. همانگونه که مشاهده می‌شود این مقدار در نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول کمتر از دو نوع دیگر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم است. به عبارت دیگر، در سلول‌های T47-D با غلظت کمتری از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول ۵۰٪ مرگ سلولی رخ می‌دهد. این در حالی است که با ۶۳ میکرومولار از

فلورسنت با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تحت نام عمومی کونژوگه ایجاد شود. سلول‌ها از اجزاء متفاوتی مانند غشاء سیتوپلاسمی، غشاء هسته‌ای، هسته و سیتوپلاسم تشکیل می‌شود و تقریباً همه مولکول‌های موجود در قسمت‌های متفاوت سلول را می‌توان با استفاده از فلورسیتومتری ردیابی و تعیین مقدار نمود [۳۲]. انکسین V، پروتئینی است که طی فرایند وابسته به کلسیم به فسفولیپیدهای غشایی و به خصوص به فسفاتیدیل سرین (PS) متصل می‌شود پس سلول‌هایی که در آغاز مسیر آپوپتوز هستند فسفاتیدیل سرین را از نیمه درونی به نیمه خارجی غشای پلاسمایی می‌فرستند. این علامتی برای سلول‌های فاگوسیتوز کننده خواهد بود تا پیش از آنکه غشای این سلول‌ها از بین برود و مواد واسطه التهابی از این سلول‌ها بیرون بریزد، به وسیله سلول فاگوسیتوز کننده حذف شوند. بنابراین سلول‌هایی که در مرحله آغازی آپوپتوز هستند از لحاظ برهمکنش با انکسین FITC-V که FITC متصل به آن فلورسانس سبزرنگ ایجاد می‌کند، مثبت هستند. سلول‌هایی که در مراحل پایانی آپوپتوز می‌باشند و یا انواع نکروتیک، دارای غشای منفذدار بوده و به رنگ فلورسانس PI اجازه ورود به درون سلول را می‌دهند. رنگ PI نیز با DNA برهمکنش می‌کند و فلورسانس قرمز ایجاد می‌کند. سلول‌های زنده برای PI و انکسین FITC-V منفی هستند [۳]. همانگونه که مشاهده می‌شود، پس از افزودن ۶۳ میکرومولار نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول در سلول‌های T47-D تعداد سلول‌های زنده کاهش یافته و درصد سلول‌های آپوپتوزی در رده سلولی نسبت به حضور نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم بدون پوشش ویژه و یا نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم حاوی پایدارکننده HNO₃ افزایش می‌یابد. این در حالی است که درصد سلول‌های نکروزی بسیار اندک و قابل چشم‌پوشی است. این نتایج با نتایج بدست آمده از رنگ‌آمیزی DAPI تطابق دارد و بیان می‌دارد که این نوع از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم موجب القای آپوپتوز بیشتری در سلول‌های T47-D می‌شود. بنابراین، می‌توان اینگونه بیان کرد که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول می‌تواند مرگ سلولی بیشتری با غلظت پایین‌تر در سلول‌های سرطان سینه T47-D القا کند. مطالعات پیشین نشان داده است که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم می‌توانند از طریق پروتئین‌های پلازما در جریان خون حرکت

کنند. همچنین می‌توانند پس از فاگوسیت شدن با ماکروفاژها در سیستم لنفاوی و از طریق مونوسیت‌ها به درون مغز قرمز استخوان حرکت کنند. گزارش شده است که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در pH ۷ دارای بار منفی هستند و به صورت انتخابی به زنجیره جانبی آمینواسیدهای دارای گروه‌های -OH، -NH₂ و -NH₂ متصل می‌شوند. به عبارتی دیگر، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم می‌تواند با جریان خون یا لنف حرکت کرده و در اطراف سلول‌ها تجمع یافته و پس از آن به پروتئین‌های غشایی متصل شده و به سلول اتصال یابد [۳۳]. بنابراین، شیمی سطح نانوذرات نقش بسیار مهمی در مقدار اتصال نانوذرات به غشا و پروتئین‌های غشایی و همچنین ورود آنها به داخل سلول ایفا می‌کند. مطالعات بسیاری در زمینه تاثیر غلظت و اندازه نانوذرات بر ایجاد مرگ سلولی و کاهش رشد سلولی در سلول‌های متفاوت انجام پذیرفته است. اما مطالعات بسیار اندکی در مورد تاثیر نوع پوشش نانوذرات بر مقدار القای مرگ سلولی و برهمکنش آنها با ماکرومولکول‌ها انجام شده است.

Thevenot و همکاران [۳۳] نشان دادند مقدار القای مرگ سلولی با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در سلول‌های متفاوت سرطانی تفاوت دارد و مقدار زنده‌مانی سلول‌های سرطانی به غلظت نانوذرات، نوع سلول‌ها و شیمی سطوح نانوذرات بستگی دارد. همچنین، آنها نشان دادند نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم (با اندازه تقریبی ۲۱ نانومتر) با پوشش سطح -NH₂ و -OH مقدار مرگ سلولی بالاتری نسبت به نانوذرات ذرات دی‌اکسید تیتانیم با پوشش سطح -COOH القا می‌کنند. Xie و همکارانش [۳۴] نیز نشان دادند که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم (با اندازه کمتر از ۱۵ نانومتر) و سطح شیمیایی با بار مثبت (TiO₂-NH₂) و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم (با اندازه کمتر از ۱۵ نانومتر) و سطح شیمیایی با بار منفی (TiO₂-COOH) به خوبی در محیط آبی پراکنده می‌شوند. همچنین طبق مطالعات آنان نانوذرات TiO₂-NH₂ سریعتر از نانوذرات TiO₂-COOH وارد سلول‌های سرطانی HeLa می‌شوند اما از سوی دیگر نانوذرات TiO₂-NH₂ ۶ ساعت زودتر از نانوذرات TiO₂-COOH سلول به طریق آگزوسیتوز از سلول خارج می‌شوند. همچنین، آنها نشان دادند که هر دو نوع نانوذرات مورد مطالعه‌شان از طریق اندوسیتوز وابسته به مصرف ATP و ماکروپینوسیتوز وارد سلول می‌شوند. اما ورود

نانوذرات $\text{TiO}_2\text{-COOH}$ از طریق اندوسیتوز وابسته به کلاترین و کاوتولین است در حالیکه ورود نانوذرات $\text{TiO}_2\text{-NH}_2$ فقط از طریق اندوسیتوز وابسته به کلاترین است. به عبارت دیگر آنان نشان دادند نوع پوشش شیمیایی نانوذرات در نحوه ورود آنها به درون سلول، مکانیزم ورود به درون سلول و مدت زمان ماندگاری در درون سلول نقش مهمی را ایفا می‌کند. بر طبق نتایج حاصل از مطالعه حاضر، می‌توان اینگونه بیان کرد که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول با ثابت اتصال بالاتری به DNA متصل شده و موجب تغییر ساختار DNA می‌شوند و از طرفی می‌توانند مرگ سلولی بیشتری با غلظت پایین‌تر در سلول‌های سرطان سینه T47-D القا نمایند. پلی اتیلن گلیکول بسیار مورد تایید FDA است. مطالعات پیشین نشان داده است که PEG غیرسمی بوده و موجب فعال شدن سیستم ایمنی نمی‌شود. همچنین، نشان داده شده است که اصلاح سطح نانوذرات با PEG مانع از تجمع نانوذرات در محیط آبی می‌شود و زیست سازگاری آنها را بالا می‌برد. پوشش نانوذرات با PEG موجب کاهش کلیبرسانس و پاک‌سازی نانوذرات از طریق سیستم رتیکیول‌اندوتلیال می‌شود [۳۳]. مطالعه Jiang و همکاران [۳۵] نشان داد که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم با پوشش‌های سطحی متفاوت شعاع هیدرودینامیکی متفاوتی دارند و نوع پوشش شیمیایی بر مقدار تجمع نانوذرات بسیار موثر است. آنها دریافتند که پوشش بسیاری بر سطح نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم موجب کاهش تجمع نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم در محیط آبی می‌شود. همچنین، آنها گزارش کردند که افزودن پلی اتیلن گلیکول بر سطح نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم آنها را در محیط آبی پایدارتر می‌کند و نانوذرات شعاع هیدرودینامیکی کمتری خواهند داشت. بنابراین با توجه به نتایج پیشین و نتایج مطالعه حاضر می‌توان اینگونه پیشنهاد کرد که، پوشش سطح نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم بر مقدار پایداری آنها در محیط آبی اثرگذار است. به عبارتی پوشش سطح در نوع و مکانیزم اتصال نانوذرات به غشا و تجمع آن در خارج سلول‌ها موثر است. امکان دارد نوع پوشش سطح نانوذرات موجب دناتوره (denaturation) یا تجمع یافتگی (aggregation) پروتئین‌های غشایی سلول‌ها شود که همین امر هم در مقدار ورود نانوذرات و در نتیجه تاثیرگذاری آنها و القای مرگ سلولی موثر خواهد بود. به عبارتی نحوه تاثیر پوشش سطح

در عملکرد مهاری نانوذرات می‌تواند به علت نوع پروتئین‌های موجود در سطح غشای سلول و همچنین نوع مکانیسم دخیل در برهمکنش این پروتئین‌ها با نانوذرات باشد که البته اثبات این فرضیه نیازمند مطالعات دقیق‌تر است. در نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم حاوی پایدارکننده HNO_3 (با اندازه ۱۰ نانومتر)، بارهای مثبت موجود در سطح موجب افزایش تمایل نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم به اتصال با غشای سلولی شده و در نتیجه تجمع این نانوذرات در اطراف غشای سلولی افزایش می‌یابد. همین امر موجب افزایش ورود نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم حاوی پایدارکننده HNO_3 به درون سلول و در نتیجه اتصال به ارگانل‌های متفاوت و DNA می‌شود که در نهایت مرگ سلولی را به همراه دارد. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد، حضور PEG بر سطح نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم اتصال و تجمع بیشتری را در اطراف غشای سلولی موجب شده است و با وجود اندازه و فاز یکسان، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول نسبت به نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم حاوی پایدارکننده HNO_3 مقدار مرگ سلولی بیشتری در سلول‌های T47-D القا کنند. همانگونه که مشاهده شد، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم بدون پوشش ویژه (با اندازه ۱۰ نانومتر)، در غلظت بسیار بالاتری (۱۹۵ میکرومولار IC_{50}) نسبت به نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول (با اندازه ۱۰ نانومتر)، موجب القای مرگ سلولی می‌گردند. این مشاهده را می‌توان اینگونه تفسیر کرد که امکان دارد در غلظت بالای نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم بدون پوشش ویژه، اطراف سلول‌های سرطانی اشباع شده و در نتیجه تاثیر پوشش چندان اهمیت پیدا نمی‌کند و در نتیجه نانوذرات وارد شده و توانسته‌اند به DNA و دیگر ماکرومولکول‌های درون سلولی متصل شده و موجب القای مرگ سلولی گردند. به عبارت دیگر در غلظت‌های کم از نانوذرات فقط اندازه نانوذرات اهمیت ندارد بلکه نوع پوشش سطحی آنها هم مهم است ولی در غلظت‌های بالای نانوذرات این موضوع کمتر اهمیت می‌یابد. بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه گرفت نوع پوشش سطح نانوذرات بر مقدار مرگ سلولی موثر خواهد بود. از آنجا که یکی از اهداف استفاده از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم درمان سرطان و هدف قرار دادن مولکول DNA و همچنین القای مرگ سلولی است، توجه به نوع و پوشش نانوذره انتخاب شده بسیار

[3] A. Hekmat, A.A. Saboury, A. Divsalar, A. Seyedarabi, "Structural effects of TiO₂ nanoparticles and doxorubicin on DNA and their antiproliferative roles in T47-D and MCF7 cells", *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 13, 932-951, 2013.

[4] C. Disdier, M. Chalansonnet, F. Gagnaire, L. Gaté, F. Cosnier, J. Devoy, W. Saba, A.K. Lund, E. Brun, A. Mabondzo, "Brain inflammation, blood brain barrier dysfunction and neuronal synaptophysin decrease after inhalation exposure to titanium dioxide nano-Aerosol in aging rats", *Sci Rep.*, 7, 12196, 2017.

[5] R.K. Shukla, A. Kumar, D. Gurbani, A.K. Pandey, S. Singh, A. Dhawan, "TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells", *Nanotoxicology*, 7, 48-60, 2013.

[6] S. Çeşmeli, C. Biray Avci, "Application of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in cancer therapies", *J Drug Target*, 27, 762-766, 2019.

[7] M. Malekshahi Byranvand, A. Nemati Kharat, L. Fatholahi, Z. Malekshahi Beiranvand, "A review on synthesis of nano-TiO₂ via different methods", *J Nanostruct*, 3, 1-9, 2013.

[8] W. Wang, W. Xiong, J. Wan, X. Sun, H. Xu, X. Yang, "The decrease of PAMAM dendrimer-induced cytotoxicity by PEGylation via attenuation of oxidative stress", *Nanotechnology*, 20, 105103, 2009.

[9] Y. Hu, J. Xie, Y.W. Tong, C.-H. Wang, "Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells", *J Control Release*, 118, 7-17, 2007.

[10] W. Eck, G. Craig, A. Sigdel, G. Ritter, L.J. Old, L. Tang, M.F. Brennan, P.J. Allen, M.D. Mason, "PEGylated gold nanoparticles conjugated to monoclonal F19 antibodies as targeted labeling agents for human pancreatic carcinoma tissue", *ACS Nano*, 2, 2263-2272, 2008.

[11] J. Okuda-Shimazaki, S. Takaku, K. Kanehira, S. Sonezaki, A. Taniguchi, "Effects of titanium dioxide nanoparticle aggregate size on gene expression", *Int J Mol Sci*, 11, 2383-2392, 2010.

مهم است.

۵- نتیجه گیری

در این پژوهش، برهمکنش نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (در فاز آنازاز) با سه پوشش متفاوت و اندازه متوسط ۱۰ نانومتر با DNA بررسی شد. همچنین، مقدار القای مرگ سلولی توسط نانوذرات بالا در سلول‌های سرطان سینه T47-D بررسی شد. با توجه به یافته‌های مشاهده شده نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول و پس از آن نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حاوی پایدارکننده HNO₃ با DNA برهمکنش قوی دارند و نانوذرات بدون پوشش نسبت به دو نوع دیگر نانوذرات تیتانیوم دی اکسید، اتصال ضعیف‌تر با DNA برقرار می‌کنند. همچنین، مقدار القای مرگ در سلول‌های سرطان سینه T47-D در حضور نانوذرات دی اکسید تیتانیوم حل شده در ماتریکس پراکنده اتیلن گلیکول بیشتر است. نتایج این مطالعه بیانگر تاثیر نوع روش احیایی و پوشش انتخابی در هنگام سنتز نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر مقدار برهمکنش آنها با ماکرومولکول‌های زیستی و همچنین، مقدار القای مرگ سلولی است. نتایج حاصل از این مطالعه برای سنتز و طراحی نانوداروها با اهداف درمانی به ویژه سرطان بسیار مهم است. به عبارت دیگر، افزون بر اندازه نانوذرات در هنگام طراحی نانوداروها، نوع پوشش نانوذرات نیز باید مورد نظر قرار بگیرد.

تعارض در منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

مراجع

[1] A. Hekmat, M. Afrough, S. Hesami Tackallou, F. Ahmad, "Synergistic effects of Titanium dioxide nanoparticles and Paclitaxel combination on the DNA structure and their antiproliferative role on MDA-MB-231cells", *J Nanoanalysis*, 7, 152-165, 2020.

[2] M. Textor, C. Sittig, V. Frauchiger, S. Tosatti, D. Brunette, "Titanium in medicine", Editors: D. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen Springer Verlag, Heidelberg and Berlin, 171, 2001.

- of silver nanoparticle: calf thymus DNA and K562 as targets”, *J Phys Chem C*, 114, 5798-5803, 2010.
- [23] N. Shahabadi, M. Maghsudi, “Multi-spectroscopic and molecular modeling studies on the interaction of antihypertensive drug; methyl dopa with calf thymus DNA”, *Mol Biosyst*, 10, 338-347, 2014.
- [24] N. Shahabadi, A.A. Asadian, M. Mahdavi, “Intercalation of a Zn (II) complex containing ciprofloxacin drug between DNA base pairs”, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 36, 676-689, 2017.
- [25] S. Huang, H. Qiu, S. Lu, F. Zhu, Q. Xiao, “Study on the molecular interaction of graphene quantum dots with human serum albumin: combined spectroscopic and electrochemical approaches”, *J Hazard Mater*, 285, 18-26, 2015.
- [26] Z. Pashah, A. Hekmat, S. Hesami Tackallou, “Structural effects of Diamond nanoparticles and Paclitaxel combination on calf thymus DNA”, *Nucleotides Nucleic Acids*, 36, 249-278, 2019.
- [27] A. Shamsi, A. Ahmed, B. Bano, “Probing the interaction of anticancer drug temsirolimus with human serum albumin: Molecular docking and spectroscopic insight”, *Biomol Struct Dyn*, 36, 1-38, 2017.
- [28] J. Kypr, I. Kejnovska, D. Renciuik, M. Vorlickova, “Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA”, *Nucleic Acids Res*, 37, 1713-1725, 2009.
- [29] N. Shahabadi, F. Shiri, M. Norouzibazaz, A. Falah, “Disquisition on the interaction of ibuprofen-Zn (II) complex with calf thymus DNA by spectroscopic techniques and the use of Hoechst 33258 and Methylene blue dyes as spectral probes”, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 37, 125-146, 2018.
- [30] N. Li, L. Ma, J. Wang, L. Zheng, J. Liu, Y. Duan, H. Liu, X. Zhao, S. Wang, H. Wang, “Interaction between nano-anatase TiO₂ and liver DNA from mice in vivo”, *Nanoscale Res Lett*, 5, 108, 2010.
- [31] A. Hekmat, A.A. Saboury, “Structural Effects of the Synthetic cobalt-Manganese-Zinc Ferrite [12] E.-J. Park, J. Yoon, K. Choi, J. Yi, K. Park, “Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation”, *Toxicology*, 260, 37-46, 2009.
- [13] D. Gao, S. Tang, Q. Tong, “Oleanolic acid liposomes with polyethylene glycol modification: promising antitumor drug delivery”, *Int J Nanomed*, 7, 3517, 2012.
- [14] K.-H. Park, E.M. Jin, H.B. Gu, S.E. Shim, C.K. Hong, “Effects of HNO₃ treatment of TiO₂ nanoparticles on the photovoltaic properties of dye-sensitized solar cells”, *Mater Lett*, 63, 2208-2211, 2009.
- [15] I. Haq, “Thermodynamics of drug-DNA interactions”, *Arch Biochem Biophys*, 403, 1-15, 2002.
- [16] A. Magrez, L. Horváth, R. Smajda, V. Salicio, N. Pasquier, L. Forro, B. Schwaller, “Cellular toxicity of TiO₂-based nanofilaments”, *ACS Nano*, 3, 2274-2280, 2009.
- [17] T. Mosmann, “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays”, *J Immunol Methods*, 65, 55-63, 1983.
- [18] A. Hekmat, Z. Hajebrahimi, A. Motamedzade, “Structural Changes of Human Serum Albumin (HSA) in Simulated Microgravity”, *Protein Pept Lett*, 24, 1030-1039, 2017.
- [19] A. Hekmat, A.A. Saboury, A. Divsalar, “The effects of silver nanoparticles and doxorubicin combination on DNA structure and its antiproliferative effect against T47-D and MCF7 cell lines”, *J Biomed Nanotechnol*, 8, 968-982, 2012.
- [20] A. Mukherjee, B. Singh, “Binding interaction of pharmaceutical drug captopril with calf thymus DNA: a multispectroscopic and molecular docking study”, *J Lumin*, 190, 319-327, 2017.
- [21] S. Patel, P. Patel, S.R. Bakshi, “Titanium dioxide nanoparticles: an in vitro study of DNA binding, chromosome aberration assay, and comet assay”, *Cytotechnology*, 69, 245-263, 2017.
- [22] M. Rahban, A. Divsalar, A.A. Saboury, A. Golestani, “Nanotoxicity and spectroscopy studies

Nanoparticles (Co_{0.3}Mn_{0.2}Zn_{0.5}Fe₂O₄ NPs) on DNA and its Antiproliferative Effect on T47D cells”, *Bionanoscience*, 9, 821-832, 2019.

[32] R. Zucker, E. Massaro, K. Sanders, L. Degen, W. Boyes, “Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry”, *Cytometry A*, 77, 677-685, 2010.

[33] P. Thevenot, J. Cho, D. Wavhal, R.B. Timmons, L. Tang, “Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO₂ nanoparticles”, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 4, 226-236, 2008.

[34] J. Xie, X. Pan, M. Wang, J. Ma, Y. Fei, P.-N. Wang, L. Mi, “The role of surface modification for TiO₂ nanoparticles in cancer cells”, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 143, 148-155, 2016.

[35] J. Jiang, G. Oberdörster, P. Biswas, “Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies”, *J Nanopart Res*, 11, 77-89, 2009.



A comparative study of three types of titanium dioxide nanoparticles effects on including cell growth inhibition in T47-D breast cancer cells and DNA Interaction

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Pilot Biotechnology, Pasteur Institute, Tehran, Iran

3- Nanobiotechnology Department, New Technologies Research Group, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract: Nowadays, titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) are being consumed in the nanotechnology industry and medicine and are synthesized in various ways. The purpose of this study was to investigate the effect of the surface coating of TiO₂NPs on their ability to initiate structural disorder in DNA along with their ability to induce growth inhibition in T47-D cells. The binding constants indicated that TiO₂NPs with ethylene glycol dispersion matrix interacted with TiO₂NPs with a higher binding constant value ($2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) compare with two other TiO₂NPs ($2.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for uncoated TiO₂NPs and $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ for TiO₂NPs contains HNO₃ stabilizer). CD spectra revealed TiO₂NPs have a significant influence on the DNA base stacking. With MTT assay, the IC₅₀ value for each NPs was calculated. DAPI staining and flow cytometry analyses confirmed that TiO₂NPs with ethylene glycol dispersion matrix (IC₅₀=63 μM) could reduce cell proliferation strongly, in comparison with two other TiO₂NPs. This study indicated that the surface coating of TiO₂NPs could affect the value of their interaction with DNA and change their growth inhibition ability. Consequently, the type of coating of nanoparticles is very important in designing nano-drugs, especially for cancer treatment.

Keywords: Breast cancer cells T47D, DAPI staining, DNA, Flow cytometry, Titanium dioxide nanoparticles