Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):565-572

Synthesis of Titanium Oxide Nanoparticles by Sol-Gel Method and Investigation of Physicochemical and Antibacterial Properties of Them on Prokaryotic and Eukaryotic Cells

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Abdolmajid E.*[1] *MSc,*
Nemati F.[1] *PhD*

How to cite this article
Abdolmajid E, Nemati F. Synthesis of Titanium Oxide Nanoparticles by Sol-Gel Method and Investigation of Physicochemical and Antibacterial Properties of Them on Prokaryotic and Eukaryotic Cells. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):565-572.

ABSTRACT

Aims The objective of this research was to develop a novel method for the synthesis of colloidal solutions of titanium dioxide nanoparticles with high stability and life span.

Materials & Methods Based on mentioned points, the issue of this study is the synthesis of nanoparticles via chemical reduction process. The morphologies, compositions, and physicochemical properties of the prepared samples were characterized by TEM, XRD and DLS. Also, the cytotoxic effect of fabricated NPs against human white blood cells (WBCs) was investigated via MTT assay. In addition, antibacterial activity was investigated.

Findings The results of this study indicate that the diameter of the synthesized nanoparticles is about 50nm and contains the anatase phase, in the range of 2θ from 25-80°C, and the hydrodynamic radius of nanoparticles is about 95.8±12.78nm and the zeta potential of nanoparticles is about -34.87±4.78mV. Also, the effect of toxicity of titanium dioxide nanoparticles on the white blood cell line showed that these nanoparticles cause the toxicity of cells at concentrations above 200µg/ml, but in lower concentrations, normal cells can survive. Also, these nanoparticles at the same low concentrations.

Conclusion In conclusion, colloidal solutions with high stability were successfully synthesized, which, in addition to increasing the antibacterial properties due to diminished dimensions.

Keywords Nanoparticles; Titanium Dioxide; Colloidal Solutions; Antibacterial Properties

[1]Biotechnology Department, New Sciences & Technologies Faculty, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Khaghani Street, Shatiati Street, Tehran, Iran. Postal Code: 1916893813
Phone: +98 (21) 33843320
Fax: +98 (21) 22763459
elhamabdolmajid@iaups.ac.ir

Article History
Received: October 8, 2018
Accepted: May 8, 2019
ePublished: December 21, 2019

CITATION LINKS

[1] Nanotechnology consumer product inventory [2] Characterization and activity of sol – gel prepared TiO2 photo catalysts modified with Ca, Sr or Ba ion additives [3] Sol-gel preparation and characterization of nanosize TiO2: Its photocatalytic performance [4] Biogenic unmodified gold nanoparticles for selective and quantitative detection of cerium using UV-vis spectroscopy and photon correlation spectroscopy (DLS) [5] Bandgap studies on anatase titanium dioxide nanoparticles [6] Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester [7] A review of TiO2 nanoparticles [8] Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery [9] Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties [10] Association of blood arsenic levels with increased reactive oxidants and decreased antioxidant capacity in a human population of northeastern Taiwan [11] Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo [12] The biological effects of nanoparticles

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

ساخت نانوذرات اکسیدتیتانیوم به روش سل-ژل و بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و آنتی‌باکتریایی این ذرات روی سلول‌های پروکایوت و یوکاریوت

الهام عبدالمجید* MSc
گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
فهیمه نعمتی PhD
گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده
اهداف: هدف از تحقیق حاضر بررسی و معرفی روشی برای سنتز محلول‌های کلوئیدی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم با پایداری و عمر بالا بود.
مواد و روش‌ها: در این روش، ابتدا نانوذرات به کمک روش شیمیایی سنتز شد و ویژگی‌های ساختار فیزیکی و شیمیایی این نانوذرات با دستگاه‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری، پراش اشعه ایکس، پراکندگی نوری دینامیکی و زتا پتانسیل مورد بررسی قرار گرفت. سپس تست بررسی سمیت سلولی نانوذرات روی سلول‌های سفید خونی با استفاده از تست MTT انجام شد. سپس فعالیت ضدباکتریایی مورد بررسی قرار گرفت.
یافته‌ها: نتایج بررسی حاکی از آن است که قطر نانوذرات سنتزشده حدود ۵۰نانومتر است و حاوی فاز آناتاز، در محدوده 2θ از ۸۰-۲۵ درجه است و اندازه شعاع هیدرودینامیکی حدود ۱۲/۷۸±۹۵/۸نانومتر و مقدار زتا پتانسیل نانوذرات حدود ٤/۷۸±۳٤/۸۷-میلی‌ولت است. همچنین بررسی اثر سمیت نانوذرات بر رده سلولی گلبول‌های سفید خون نشان داد که این نانوذرات باعث سمیت سلول‌ها در غلظت‌های بالای ۲۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر شده است ولی در غلظت‌های پایین باعث زنده‌ماندن سلول‌های نرمال شد. همچنین در همین غلظت‌های پایین سلول‌های باکتری را از بین برده است.
نتیجه‌گیری: در نتیجه این پژوهش، محلول‌های کلوئیدی با پایداری بسیار بالا با موفقیت فرآوری شد و می‌توان از این نانوذره به‌عنوان یک عامل ضدباکتری در تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید بهره برد.
کلیدواژه‌ها: نانوذره، دی‌اکسیدتیتانیوم، محلول کلوئیدی، سمیت سلولی، خاصیت ضدمیکروبی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۱۸
*نویسنده مسئول: elhamabdolmajid@iaups.ac.ir

مقدمه

نانوفناوری یک دانش میان‌رشته‌ای است و به رشته‌هایی چون فیزیک کاربردی، مهندسی مواد، مهندسی مکانیک، مهندسی برق، مهندسی شیمی و رشته‌های مرتبط با زیست‌شناسی نیز مربوط می‌شود. در دهه‌های اخیر، فناوری نانو رشد بسیار سریعی داشته است به‌طوری که امروزه از آن در بسیاری از کالاهای مورد مصرف انسان استفاده می‌شود. بررسی بازار ۳۰ کشور در سراسر جهان حاکی از آن است که تا تاریخ اکتبر ۲۰۱۳ میلادی، تعداد محصولات مبتنی بر فناوری نانو به ۱۶۲۸ محصول رسیده است[1].

در این میان، نانوذرات یکی از رایج‌ترین عناصر در فناوری نانو هستند. در حقیقت نانوذرات مجموعه‌ای از اتم‌ها و مولکول‌ها با قطر بین یک تا ۱۰۰نانومتر هستند. سنتز نانوذرات فلزی و اکسید فلزی توجه زیادی را در علوم فیزیک، شیمی، زیست‌شناسی، پزشکی، اپتیکی، مکانیکی و مهندسی به خود جلب کرده است، به‌طوری که تکنیک‌های جدیدی برای بررسی و دستکاری اتم‌ها و مولکول‌ها در حال توسعه هستند. نانوذرات فلزی و اکسید فلزی دارای سطح زیادی هستند و کسر زیادی از اتم‌ها را تشکیل داده‌اند که این امر موجب خواص جالبی مانند فعالیت ضدمیکروبی، مغناطیسی، الکترونیکی و کاتالیزوری آنها شده است[2]. تولید نانوذرات با استفاده از روش‌های شیمیایی نیز امکان‌پذیر است. به‌طور مثال نانوذرات اکسیدتیتانیوم را می‌توان با استفاده از یک روش مبتنی بر فناوری سبز و سازگار با محیط زیست در مقیاس آزمایشگاهی سنتز نمود. با توجه به نکات ذکرشده، مساله مورد مطالعه در این پژوهش سنتز نانوذرات اکسیدتیتانیوم به کمک احیای شیمیایی و بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و تعیین سمیت آن بر سلول‌های سفید خونی و خواص ضدباکتریایی آن است.

مواد و روش‌ها

شایان ذکر است که در تحقیق حاضر ساخت نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم براساس مطالعه *ونکچالم* و همکاران انجام شد[3]. بر این اساس، مقدار ۱۸/٦میلی‌لیتر تیتانیوم‌ایزوپروپوکسید به ۳۵/۷میلی‌لیتر اسیدسیتریک در دمای 4^oC اضافه شد. سپس مقدار ۳۹۵میلی‌لیتر آب مقطر دوبار یونیزه به این محلول به‌صورت قطره‌چکان اضافه و به‌وسیله دستگاه همزن مغناطیسی (استیرر) به‌مدت یک‌ساعت در دور ۲۰۰rpm همزده شد. پس از آن، محلول به‌دست‌آمده در دمای 90^oC به‌مدت ۱۲ساعت خشک و سپس در دمای 500^oC به‌مدت ۴ساعت کلسینه شد.

در این تحقیق برای بررسی اندازه، پتانسیل سطح ذره، توزیع پراکندگی و مورفولوژی نانوذرات، از یک‌سری روش‌ها استفاده شد که هر کدام در زیر جداگانه توضیح داده شده است.

میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری (TEM): TEM ابزاری ویژه در مشخص‌نمودن ساختار و مورفولوژی مواد محسوب می‌شوند که مطالعات نانوذره ساخته‌شده با قدرت تفکیک بالا و بزرگ‌نمایی خیلی‌زیاد را امکان‌پذیر می‌سازند. علاوه بر این، از این میکروسکوپ‌ها به‌منظور مطالعات ساختارهای بلور، تقارن، جهت‌گیری و نقایص بلوری می‌توان استفاده نمود. بر این اساس، ابتدا نمونه‌های نانوذره سونیکه و سپس توسط TEM تعیین قطر و مورفولوژی شدند.

پراش اشعه ایکس (XRD): در این روش از پراش اشعه ایکس توسط نمونه برای بررسی ویژگی‌های نمونه استفاده می‌شود. روش XRD برای تعیین خصوصیات ساختار کریستالی از قبیل ثابت شبکه، هندسه شبکه، تعیین کیفی مواد ناشناس، تعیین فاز

www.SID.ir

Archive of SID

کریستال‌ها، تعیین اندازه کریستال‌ها، جهت‌گیری تک کریستال، استرس، تنش، عیوب شبکه و غیره، مورد استفاده قرار گرفت. بر این اساس به‌منظور تهیه WRD، الگوی پراش اشعه ایکس از دستگاه پراش‌سنج پودری X'pert Pro (فیلیپس؛ هلند) با طول موج Cu Kα با منبع لامپ اشعه ایکس مس λ =۱/۵٤۰۵٦A° استفاده شد.

پراکندگی نور دینامیکی (DLS): زمانی که نور به جسم کوچکی مانند یک ذره یا یک مولکول برخورد می‌کند جهت آن تغییر می‌کند در این حالت پراکندگی نوری رخ می‌دهد، اگر نور در اثر برخورد با ذره ناپدید شود، پدیده جذب اتفاق می‌افتد. روش DLS که به طیف‌سنجی همیشگی فوتون (PSS) نیز معروف است، حرکت براونی درون محلول را اندازه می‌گیرد و ارتباط آن را با اندازه ذره بیان می‌دارد[4].

پراکندگی نور دینامیکی روشی فیزیکی است که برای تعیین اندازه شعاع هیدرودینامیک، میزان توزیع پراکندگی نانوذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون استفاده می‌شود. این روش غیرمخرب و سریع به‌منظور تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود.

شعاع هیدرودینامیک و پتانسیل زتا نانوذرات با استفاده از روش DLS و به کمک زتا پتانسیل آنالایزر در ۶۵۷نانومتر و زاویه ثابت ۹۰درجه اندازه‌گیری شد. بدین‌ترتیب که ابتدا محلول نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم مطابق روش ذکرشده ساخته شد، سپس محلول حاصله با آب دوبار تقطیر ده‌بار رقیق و ۵دقیقه سونیکه شد. ۵۰۰میکرولیتر از نمونه، داخل سل دستگاه قرار گرفت و پتانسیل سطح و شعاع هیدرودینامیکی نانوذره توسط دستگاه تعیین شد.

زتا پتانسیل: زتا اختلاف پتانسیل بین آخرین محلول دربرگیرنده ذرات کلوئید و اولین لایه غیرمتحرک از حلال اطراف ذرات کلوئید است. در این روش بار سوسپانسیون نانوذره نیز توسط دستگاه DLS تعیین شد. شایان ذکر است که غلظت نانوذرات برابر با یک‌میکرومولار بود.

در این مطالعه سلول‌های خونی سفید (WBCs) به کار رفتند که به‌صورت تازه استخراج شد.

سلول‌های خونی سفید انسانی با استفاده از بافر لیز گلبول قرمز از خون جدا شد. بر این اساس، ابتدا کل خون به‌مدت ۵دقیقه در دور ۳۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس توسط بافر لیز گلبول قرمز رقیق و به‌مدت ۱۰دقیقه در دمای اتاق هم‌زده شد. پس از آن، دوباره به‌مدت ۵دقیقه در دور ۳۰۰g سانتریفیوژ و در بافر نمکی فسفات PBS حل شد و سپس شست‌وشو صورت گرفت. پس از آن دوباره به‌مدت ۵دقیقه در دور ۳۰۰g سانتریفیوژ و درنهایت در محیط کشت سلولی کشت داده شد.

برای کشت سلول‌ها، سلول‌های تهیه‌شده در محیط کشت RPMI 1640 (گیبکو؛ انگلستان) همراه با افزودنی‌های شامل سرم جنین گاوی ۱۰% (FBS؛ گیبکو؛ انگلستان) سرم اسب ۵% (سرم اسبی) و ۲میلی‌مولار ال-گلوتامین (سیگما؛ ایالات متحده آمریکا) کشت داده و در فلاسک‌های کشت ٤۰میلی‌لیتری در انکوباتور ۳۷°C دی‌اکسیدکربن‌دار ۵% نگه‌داری شدند.

برای تهیه محیط کشت سلولی RPMI -1640، ابتدا ۱۰/٤گرم پودر RPMI-1640 داخل ارلن یک‌لیتری ریخته شد که از قبل داخل آن آب مقطر دوبار تقطیرشده ریخته شده است و سپس ۲گرم بیکربنات‌سدیم به آن اضافه شد. بعد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (۱%) به محیط اضافه نموده و درنهایت pH محلول به‌وسیله اسیدهیدروکلیردریک به ۷/٤ رسانده شد. محلولی که تهیه شد را با استفاده از دستگاه فیلتراسیون فیلتر نموده و به ظرف شیشه‌ای استریل‌شده منتقل و در یخچال نگهداری شد. برای کشت و تکثیر سلول‌ها به این محیط ۱۰% سرم جنین گاوی (FBS) اضافه شد.

برای تیمار سلول‌ها ابتدا ۱×۱۰^{٤} سلول را در یک‌میلی‌لیتر محیط کشت در ظرف کشت تست ریخته و غلظت‌های مختلف نانوذرات تیتانیوم‌اکسید سنتزشده برای زمان ۲٤ساعت تیمار شد. به‌منظور تهیه استوک از نانوذرات تیتانیوم‌اکسید سنتزشده محلول در بافر فسفات‌سدیم استفاده شد.

اندازه‌گیری حیات و تکثیر سلول‌ها کاربردهای مختلفی در تحقیقات دارد. بر این اساس، تست MTT یکی از قدیمی‌ترین روش‌های مورد استفاده است که حساسیت کافی دارد. برای تهیه استوک MTT، ۵میلی‌گرم از این ترکیب تترازولیوم در یک‌میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات حل شد. سلول‌ها در ظروف کشت ۹٦خانه‌ای کشت و با غلظت‌های متفاوت نانوذرات سنتزشده (یک تا ۲۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر) و برای مدت‌زمان ۲٤ساعت تیمار شدند. سپس ۱۰ماکرولیتر از استوک MTT به سلول‌ها اضافه شد. به‌مدت ۴ساعت در انکوباسیون قرار داده شدند و ۱۰ماکرولیتر DMSO اضافه و جذب در ۵۷۰نانومتر توسط دستگاه الایزاریدر بررسی شد.

برای تعیین IC_{50} ابتدا به تعریف آن پرداختیم IC_{50}، یعنی غلظتی از نانوذرات تیتانیوم‌اکسید سنتزشده که ۵۰% رشد سلول‌ها را مهار کند. در نتیجه برای یافتن دوز مناسب به‌منظور آزمایشات بعدی، سلول‌ها را در ظروف کشت ۹٦تایی با غلظت‌های مختلف نانوذرات تیتانیوم‌اکسید سنتزشده تیمار کرده و میزان مهار مشاهده شد.

برای تهیه محیط‌های کشت باکتری (BH) ابتدا به‌وسیله ترازوی دیجیتال، ۳۷گرم پودر برین‌هارت را درون ارلن حاوی آب مقطر ریخته و حجم آن به ۱۰۰۰میلی‌لیتر رسانده شد، سپس به نسبت ۱/۵% به آن آگار اضافه شد. ارلن تکان داده شد تا محتویات آن کاملاً حل شود. سپس pH محیط در ۷/۲-۷/۶ تنظیم و برای استریل‌کردن داخل اتوکلاو قرار داده شد. پس از آن که حرارت محیط به ۴۰ تا ۵۰°C رسید، در شرایط استریل داخل پلیت‌ها توزیع شد.

برای ارزیابی میزان اثر ضد باکتری نانوذرات اکسید تیتانیوم از سه سویه *اشرشیا کلی* (ATCC 25922)، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC259، *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 استفاده شد. به‌منظور آماده‌سازی باکتری‌ها به‌منظور انجام تلقیح، ابتدا یک لوپ از باکتری‌های نگهداری‌شده روی محیط کشت برین‌هارت به محیط برین‌هارت‌براث استریل انتقال داده و به‌مدت ۲۴ساعت در دمای

www.SID.ir

Archive of SID

$37^{o}C$ در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰rpm قرار داده شدند، وقتی باکتری‌های مورد نظر به فاز لگاریتمی رشدشان رسیدند، دستگاه اسپکتروفتومتری روی طول موج ۶۰۰نانومتر و با محیط برین‌هارت‌براث تنظیم شد. سپس لوله‌های محتوی باکتری توسط اسپکتروفتومتر با نمونه ۰/۵مک‌فارلند مقایسه و نمونه مناسب تلقیح تهیه شد.

بررسی خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم: به‌منظور تهیه میکروارگانیزم‌های فعال سویه استاندارد، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* از آزمایشگاه مرکزی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌صورت‌لیوفیلیزه استفاده شد. آمپول حاوی میکروب‌ها با احتیاط کامل در شرایط استریل شکسته شد. سپس به مقدار ۰/۵میلی‌لیتر از محیط کشت BHI- براث به داخل آمپول‌ها تزریق شد. سپس توسط پیپت‌پاستور از ترکیبات سوسپانسیون باکتری به محیط کشت‌های مایع و جامد که از قبل آماده شده بود تلقیح و به‌مدت ۲۴ساعت در دمای $37^{o}C$ انکوبه و سپس در محیط BHI- آگار به روش چمنی چهار مرحله‌ای کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ساعت در دمای $37^{o}C$ انکوبه شد. پس از آن، برای تهیه سوسپانسیون میکروبی در مجاورت شعله تعدادی کلنی از کشت ۲۴ساعته در لوله‌های آب مقطر استریل قرار داده شد و کدورت حاصل از سوسپانسیون توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در ۶۰۰نانومتر معادل استاندارد ۰/۵مک‌فارلند رویت شد.

سنجش اثر ضدباکتریایی نانوذرات اکسیدتیتانیوم به‌تنهایی در ممانعت از رشد باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش چاهک‌گذاری انجام شد.

روش چاهک‌گذاری بدین‌صورت بود که ابتدا غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسیدتیتانیوم از یک دوم تا یک صد و بیست و هشتم تهیه شد. سوسپانسیون باکتری‌های فوق‌الذکر به‌طور جداگانه در محیط کشت برین‌هارت‌براث تهیه و در دمای $37^{o}C$ برای ۱۰ساعت انکوبه شدند. به‌منظور انجام روش چاهک‌گذاری به این شکل عمل شد که ابتدا با کمک سوآپ سترون از سوسپانسیون هر یک از باکتری‌های فوق‌الذکر در تمام سطح پلیت حاوی محیط برین‌هارت‌آگار کشت چمنی داده و سپس چاهک‌هایی به قطر ۶/۵میلی‌متر در محیط کشت ایجاد شد. از هر یک از غلظت‌های نانوذرات اکسیدتیتانیوم میزان ۶۰میکرولیتر داخل چاهک‌ها ریخته شد. پلیت‌ها همگی در دمای $37^{o}C$ به‌مدت ۱۸ الی ۲۴ساعت انکوبه شدند. درنهایت قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری و با یکدیگر مقایسه شد.

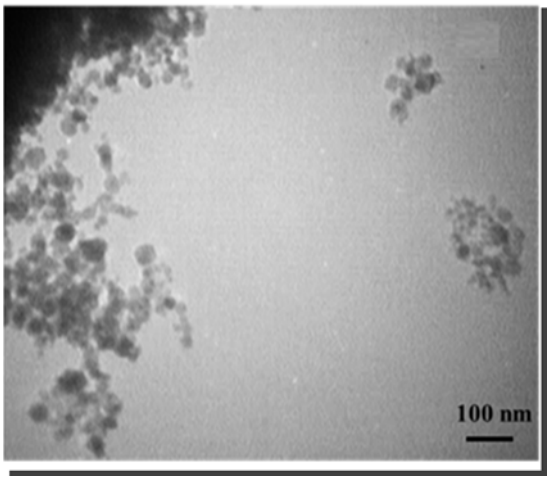
تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد نمونه‌ها به روش میکرودایلوشن: روش میکرودایلوشن، روش تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد با استفاده از پلیت‌های ۹۶خانه است. تعیین حداقل غلظت مهاری در این روش بر پایه مشاهده چشمی کدورت یا تشخیص کدورت با استفاده از جذب نوری توسط دستگاه الایزاریدر است.

در مطالعه حاضر نیز از پلیت ۹۶خانه ته‌گرد و با حجم ۲۰۰میکرولیتر استفاده شد. غلظت‌های متوالی ۸-۰/۲۵ اکسیدتیتانیوم و غلظت‌های متوالی آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین ۱۲۸-۱ تهیه شد. ۱۰۰میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اکسیدتیتانیوم، آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین به هر چاهک انتقال داده شد. سپس یک‌میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده و به آن اضافه شد محتویات هر چاهک به‌مدت ۲دقیقه توسط پلیت‌ریدر مجهز به شیکر مخلوط شد. یکی از چاهک‌های پلیت که فقط حاوی محیط کشت و باکتری بود به‌عنوان کنترل مثبت و یکی دیگر از چاهک‌ها که فقط حاوی محیط کشت بود به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

درنهایت میکروپلیت برای ۲۴ساعت در دمای $37^{o}C$ انکوباسیون شد. بعد از اتمام انکوباسیون، کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها به‌صورت چشمی مشاهده و جذب نوری در طول موج ۶۳۰نانومتر توسط دستگاه الایزاریدر خوانده شد.

یافته‌ها

بررسی میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری (TEM): شکل ۱ تصویر میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم تولیدشده را نشان می‌دهد. همان‌طور که نشان داده شده است، نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتزشده یک توزیع اندازه باریک با قطر متوسط حدود ۵۰نانومتر را ایجاد می‌کند. این تصویر همچنین نشانگر تشکیل مجموعه گروه‌های نانوذرات است، که ممکن است به مسیر ساخت نانوذرات مربوط شود.



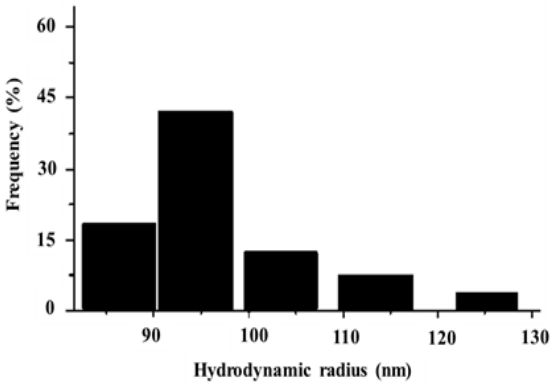
شکل ۱) تصویر میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتزشده

بررسی پراکندگی نور دینامیکی (DLS): همچنین بررسی پراکندگی نور دینامیکی به‌منظور اندازه‌گیری میزان توزیع پراکندگی نانوذرات و شعاع هیدرودینامیکی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم تولیدشده انجام شد. نمودار ۱ نشان می‌دهد که اندازه شعاع هیدرودینامیکی نانوذره حدود ۱۲/۷۸±۹۵/۸نانومتر است. درواقع، شعاع هیدرودینامیکی عمدتاً بزرگ‌تر از توزیع اندازه تعیین‌شده از ریزشکل

www.SID.ir

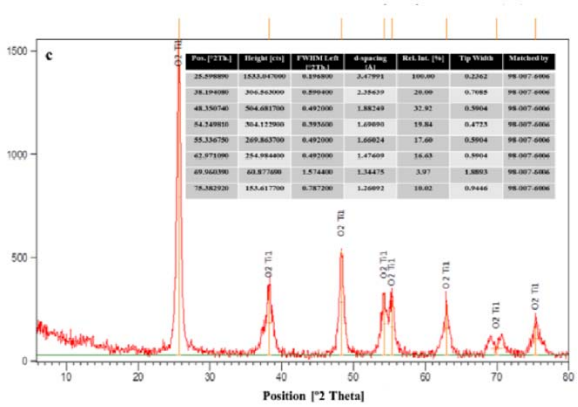
Archive of SID

(میکروگراف) TEM به‌علت اثرات حلال و پیوندهای هیدروژنی مرتبط بین نانوذرات و مولکول‌های آب است.



نمودار ۱) بررسی پراکندگی نور دینامیکی (DLS) نشان می‌دهد که اندازه هیدرودینامیکی نانوذره حدود ۱۲/۷۸±۹۵/۸نانومتر است.

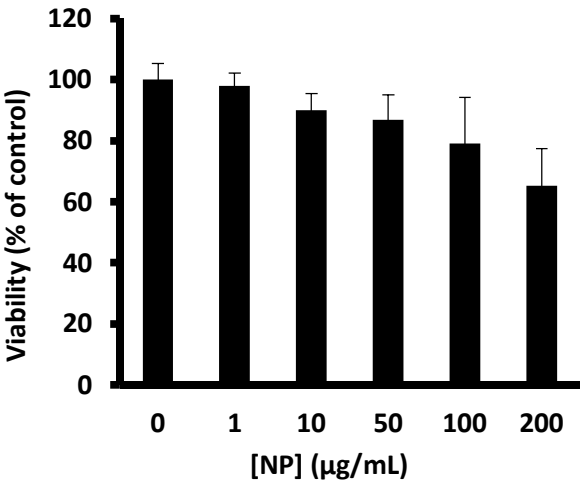
بررسی پراش اشعه ایکس (XRD): نمودار ۲ الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات تولیدشده را نشان می‌دهد. با توجه به داده‌های XRD، نمونه مورد بررسی حاوی فاز آناتاز دی‌اکسیدتیتانیوم، در محدوده ۲θ از ۸۰-۲۵ درجه است. از آنجایی که فازهای مختلف بلوری در گروه XRD وجود دارد، می‌توان نتیجه گرفت که اکثر نانوذرات تولیدشده در نمونه فاز آناتاز را نشان می‌دهند. در مطالعه *ردی* و همکاران تولید سل-ژل منجر به تشکیل ماهیت کریستالی اشباع‌شده در نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم از جمله فاز آناتاز می‌شود[5].



نمودار ۲) الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات تولیدشده

بررسی زتا پتانسیل: همچنین آنالیز زتا پتانسیل به‌منظور تعیین بار سطحی نانوذره تولیدشده انجام شد. نتایج بررسی حاکی از آن است که مقدار زتا پتانسیل نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم حدود ۳٤/۸۷±٤/۷۸- میلی‌ولت است. این داده‌ها ممکن است پایداری کلوئیدی نسبتاً خوبی از نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم تولیدشده را نشان دهند.

تست MTT: سلول‌های خونی سفید انسانی انکوبه‌شده با دوزهای مختلفی از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ساخته‌شده از یک تا ۲۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر در محیط مناسب کشت قرار داده شد و درصد سلول‌های زنده با استفاده از تست MTT تعیین شد. داده‌های آزمایشی مرتبط در نمودار ۳ نشان داده شده است. بر این اساس، نتایج حاکی از آن است که مرگ‌ومیر سلولی در رفتاری وابسته به دوز مورد استفاده، پس از ۲٤ساعت قرارگرفتن سلول‌های خونی سفید در معرض نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم تحریک می‌شوند. پس از ۲٤ساعت، غلظت‌های مختلف نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم تا ۱۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر هیچ اثری از سمیت سلولی را برای تکثیر سلول‌های خونی سفید انسانی نشان نداد. مهار رشد سلولی سلول‌های خونی سفید پس از قرارگرفتن در معرض غلظت بالاتر (۲۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر) از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ($p^*<0/05$) به‌طور قابل توجهی در مدت ۲٤ساعت کاهش یافت. درواقع، نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم اثرات قابل توجهی روی سلول‌های خونی سفید انسانی در غلظت ۲۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر از خود نشان دادند و دوزهای پایین‌تر در مقایسه با کنترل نشانه‌ای از سمیت سلولی در برابر سلول‌های خونی سفید انسانی در بر نداشت.



نمودار ۳) درصد سلول‌های زنده با استفاده از آزمون MTT

مطالعات خواص ضدباکتری نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم: جدول ۱ مقدار MIC و MBC نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم قرار داده‌شده در برابر سه سویه باکتری را نشان می‌دهد. تمامی ارقام دلالت بر آن دارند که نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم اثرات ضدباکتری قوی روی گونه‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، و *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌ترتیب با MIC=۵۰±۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، MIC=۵۰±۰/۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و MIC=۲۵±۱/۷۷ میکروگرم در میلی‌لیتر از خود نشان می‌دهند.

جدول ۱) مقادیر MIC و MBC نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در برابر سه سویه باکتری (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

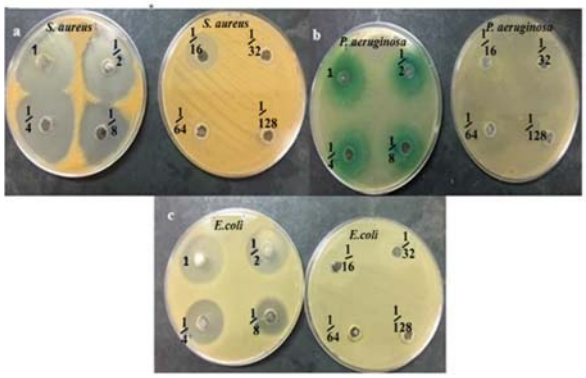
باکتری	MIC	MBC
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۵±۱/۷۷	۲۵±۱/۷۷
سودوموناس آئروجینوزا	۵۰±۰/۸۰	۵۰±۰/۵۰
اشرشیا کلی	۵۰±۰/۷۷	۵۰±۰/۵۷

www.SID.ir

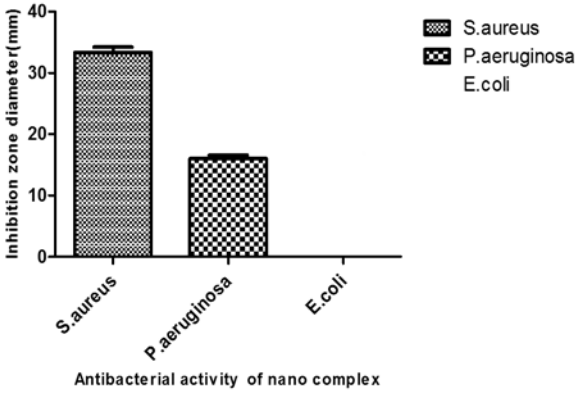
Archive of SID

همچنین مقدار MBC مشاهده‌شده در تحقیق حاضر برای نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتزشده به‌ترتیب با ۰/۵۷±۵۰میکروگرم در میلی‌لیتر، ۰/۵۰±۵۰میکروگرم در میلی‌لیتر و ۱/۷۷±۲۵میکروگرم در میلی‌لیتر برای گونه‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، و *استافیلوکوکوس اورئوس* بود.

فعالیت‌های ضدباکتری نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم پس از آماده‌سازی در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج مطالعات بیانگر آن است که نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم اثرات ضدباکتریایی نسبت به گونه‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان می‌دهند. نمودار ۴ قطر منطقه بازدارندگی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در برابر گونه‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را نشان می‌دهند.



شکل ۲) منطقه بازدارندگی ایجادشده توسط نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در برابر سه گونه باکتری (a) *استافیلوکوکوس اورئوس*، (b) *سودوموناس آئروژینوزا*، (c) *اشرشیا کلی*



نمودار ٤) فعالیت‌های ضدباکتری نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در برابر سویه‌های باکتری تست‌شده به‌وسیله روش چاهک پلیت (اندازه‌گیری قطر منطقه بازدارندگی به میلی‌متر)

بحث

توسعه مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها در آینده نزدیک بیماری‌های عفونی را به یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های سلامتی در سراسر جهان تبدیل خواهد کرد. *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از انواع رایج میکروارگانیزم‌هایی است که سبب عفونت در جراحات می‌شود. این باکتری آنزیم بتالاکتاماز را تولید می‌کند که موجب مقاومت به پنی‌سیلین می‌شود[6].

بنابراین به‌کارگیری راهکارهای جدید برای اثربخشی بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها در دوزهای پایین‌تر امری ضروری به نظر می‌رسد. در این راستا، موادی با ابعاد نانو وارد میدان شده‌اند که نقش این نانومواد به‌عنوان عوامل جدید ضدمیکروبی و نیز حامل‌هایی برای رساندن آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌های عفونی شامل نوع مقاوم به آنتی‌بیوتیک، هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در مدل‌های حیوانی ثابت شده است.

می‌توان گفت که دلایل زیادی برای استفاده از نانوذرات به‌عنوان عوامل ضدباکتریایی وجود دارد. یکی از این عوامل، سطح وسیع یک نانوذره نسبت به حجم آن است که منجر به ایجاد ویژگی‌های مختلفی همچون ویژگی‌های مکانیکی، شیمیایی، الکتریکی، نوری و مغناطیسی منحصربه‌فردی در نانوذره می‌شود که نانوذره را از شکل توده‌ای آن متفاوت می‌سازد.

در این میان، اکسیدتیتانیوم از جمله موادی است که می‌توان از خاصیت ضدباکتریایی آن استفاده نمود. خواص جالب این نانوذره فلزی شامل سمیت پایین و عدم واکنش آلرژیک یا درماتیت تماسی علاوه بر خواص متعدد فیزیکی، الکتریکی، نوری و فتوکاتالیستی است که مورد توجه محققان علوم مختلف قرار گرفته است. نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم به‌دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد آن می‌تواند در تولید انواع رنگ، لوازم آرایشی و بهداشتی، ساخت سرامیک، ساخت فتوکاتالیست‌ها، تصفیه آب و فاضلاب، فیلتراسیون گازها و بسیاری از صنایع دیگر کاربرد داشته باشد[7].

در این مطالعه، از روش آقای *ونکچالم* توسط روش سل-ژل برای ساخت نانوذرات اکسیدتیتانیوم استفاد و سپس به‌وسیله TEM، XRD، DLS و زتا پتانسیل تعیین ساختار شد.

اندازه کوچک‌تر از ۱۰۰نانومتر این امکان را فراهم می‌کند که نانوذره از طریق رگ‌های خونی و عبور از منافذ موجود در دیواره اپیتلیال به بافت نفوذ کند که به‌عنوان یک مزیت برای نانوذره به‌منظور دارورسانی و پروتئین‌رسانی محسوب می‌شود[8].

در آزمایشات انجام‌شده، پتانسیل زتا نانوذرات، حدود ۳٤/۸۷±٤/۷۸-میلی‌ولت بود که نشان‌دهنده پایداری نانوذرات و امکان نگهداری طولانی‌مدت ذرات است.

پتانسیل زتا که همان بار سطح است، به‌طور عمده می‌تواند بر پایداری ذره در سوسپانسیون از طریق دافعه الکتروستاتیک بین ذرات تاثیرگذار باشد. مطالعات *ین* و همکاران نشان می‌دهد که نانوذرات با بار سطحی بالای ۳۰میلی‌ولت پایدارتر هستند و این مساله از به‌هم‌چسبیدن ذرات جلوگیری می‌کند و منجر به افزایش پایداری نانوذرات می‌شود[9].

به‌منظور بررسی سمیت سلولی نانوذرات ساخته‌شده روی رده سلول‌های سفید خونی، ابتدا کشت سلول انجام و سپس درصد سلول‌های زنده با استفاده از تست MTT تعیین شد.

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌گیری تعداد گلبول‌های سفید در غلظت‌های کم نشان‌دهنده افزایش گلبول‌های سفید بود که بیان می‌دارد در ابتدا بدن در جهت مقابله با این ذرات ورودی تولید گلبول‌های سفید را افزایش می‌دهد ولی با تضعیف بدن در غلظت‌های بالا با کاهش تولید گلبول‌های سفید مواجه هستیم. به نظر می‌رسد نانوذره اکسیدتیتانیوم فرآیندهای مختلفی را در بدن تحت تاثیر قرار می‌دهد[10].

پیش‌بینی می‌شود نانوذرات با افزایش التهاب غدد لنفاوی، درگیری سلول‌ها در واکنش‌های التهابی را بیشتر کرده و به موازات آن موجب افزایش انتقال لنفوسیت‌های مرحله G ۱ به مرحله S تقسیم سلولی می‌شود. در ضمن مسمومیت‌های ناشی از نانوذرات اکسیدتیتانیوم فعالیت غده تیموس را کاهش می‌دهد، این غده در تکامل ایمونولوژیکی سلول‌های T دارای نقش بسیار مهمی است[11].

همچنین در جریان مسمومیت ناشی از نانوذرات اکسیدتیتانیوم پیش‌بینی می‌شود واکنش‌های استرس‌اکسیداتیو در سلول‌های سیستم ایمنی افزایش یابد.

بعضی از این عوامل موجب کاهش و برخی باعث افزایش میانگین تعداد سلول‌های سفید خونی می‌شوند. بسته به این که نانوذرات اکسیدتیتانیوم در چه غلظتی و طی چه مدتی استفاده شود می‌تواند هر یک از مراحل ذکرشده کاهش یا افزایش سلول‌های سفید خونی را موجب شود. پیش‌بینی می‌شود غلظت بالای اکسیدتیتانیوم به‌علت مهار فعالیت سلول، خاصیت آنتی‌بیوتیک و همچنین تحریک استرس‌اکسیداتیو در سلول و کاهش آنتی‌اکسیدانت‌های سلولی و افزایش درگیری سلول‌ها در فرآیندهای ایمنی موجب کاهش تعداد سلول‌های خونی می شود[11].

برای جبران این کاهش، بدن تولید سلول‌های سفید را افزایش می‌دهد. التهاب ایجادشده در غدد لنفاوی نیز به افزایش تعداد سلول‌های سفید کمک می‌کند، ولی با گذشت زمان فعالیت این غدد ضعیف شده و غدد لنفاوی دچار آتروفی می‌شوند که جبران‌ناپذیر خواهد بود. در نتیجه در مسمومیت‌های شدید کاهش تعداد سلول‌ها ظاهر می‌شود.

گزارش شده است نانوذرات همراه با فعالیت زیاد احتمالاً در بافت‌های هدف نفوذ می‌کنند و سبب عملکرد نامطلوب اندام‌ها می‌شوند. نانوذرات می‌توانند به اعماق بافت‌ها نفوذ کنند و به سیستم لنفاوی راه یابند[12].

به‌منظور بررسی خواص ضدباکتریایی نانوذرات ساخته‌شده، ابتدا باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* کشت داده شدند و تست‌های تاییدی برای فرم مقاوم انجام شد. سپس حداقل غلظت مهاری هر سه سویه تعیین شد. همچنین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها اندازه‌گیری شد. حداقل غلظت مهاری (MIC) استافیلوکوکوس، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیا کلی* به‌ترتیب ۲۵، ۷۰ و ۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

در مجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ساخت نانوذرات اکسیدتیتانیوم چندین مزیت از جمله افزایش پایداری و سمیت پایین در زنده‌مانی سلول‌های سفید خونی و پتانسیل افزایش بازده فعالیت ضدمیکروبی آن را در پی دارد. اکسیدتیتانیوم با داشتن خاصیت ضدباکتریایی می‌تواند حداقل غلظت مهاری را به خصوص در مقابل سویه مقاوم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* کاهش دهد که امروزه یکی از عمده‌ترین مسایل در درمان بیماری‌های عفونی است. در نتیجه دوز مصرفی آنتی‌بیوتیک و متعاقب آن اثرات جانبی نامطلوب دارو می‌تواند کاهش یابد که البته اثبات آن، نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

علاوه بر این، شیوع و ظهور مقاومت میکروبی و باکتری‌های مقاوم در بیماری‌های مختلف باعث شده است که بررسی و توسعه راهبردهای درمانی بهتر و موثرتر از جمله آنتی‌بیوتیک‌های جدید ضروری به نظر برسد. بنابراین امروزه تحقیقات درباره نانوذرات دارای فعالیت ضدباکتری یکی از مهم‌ترین زمینه‌های مطالعاتی در حوزه علوم زیست‌پزشکی و دارویی به شمار می‌آید. بنابراین نانومواد به‌دلیل خاصیت ضدمیکروبی بسیار موثر خود جایگاه ویژه‌ای در پزشکی به خصوص در تشخیص و درمان بیماری‌های گوناگون دارند.

در آزمایش سلولی مشاهده شد که نانوذرات اکسیدتیتانیوم روی سلول‌های بنیادی انسان در غلظت‌های بالا (۲۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر) اثر سمیت و کشندگی دارند. این مقدار بسیار بالاتر از مقادیر MIC نانوذرات در برابر باکتری‌ها، از جمله *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* هستند. به‌طور کلی اگر این موضوع در مورد عوامل بالقوه آنتی‌بیوتیک به کار رود، وجود نانوذراتی که سلول‌ها را در برابر سمیت سلول‌های نانوذرات محافظت نمایند، کاربردی و قابل اجرا به نظر می‌رسد.

در این مطالعه مقدار MIC نانوذرات اکسیدتیتانیوم برای باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* ۵۰میکروگرم در میلی‌لیتر و برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۵میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. فعالیت ضدباکتریایی قوی‌تر نانوذرات در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* ممکن است به‌دلیل تفاوت ساختار و ضخامت دیواره سلولی این باکتری‌ها باشد.

به هر حال، نوآوری این اثر از آنجا مشخص می‌شود که نانوذرات اکسیدتیتانیوم ساخته‌شده هیچ‌گونه اثرات مضری روی سلول‌های خونی سفید انسانی ندارند، در حالی که اثرات ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای در برابر میکروارگانیزم‌ها از خود نشان می‌دهند.

در ادامه برای پژوهش‌های آینده پیشنهاد می‌شود که مورد ذکرشده در ذیل مورد تحقیق و بررسی قرار گیرد:

به نظر می‌رسد که تفاوت بین نتایج مطالعه حاضر و سایر داده‌های گزارش‌شده به‌دلیل پایداری کلوئیدی، زتا پتانسیل، مورفولوژی و توزیع اندازه نانوذرات است. بنابراین پیشنهاد می‌شود که نانوذرات اکسیدتیتانیوم ساخته‌شده از لحاظ ابعاد، اصلاح سطح و پایداری کلوئیدی بهینه شوند تا کارآیی ضدمیکروبی آنها بهبود یابد.

نتیجه‌گیری

در نتیجه این پژوهش، محلول‌های کلوئیدی با پایداری بسیار بالا با

www.SID.ir

Archive of SID

موفقیت فرآوری شد و مورد آزمون‌های مشخصه‌یابی قرار گرفت. همچنین با کاهش ابعاد نانوذرات، از مقدار مصرفی دی‌اکسیدتیتانیوم بسیار کاسته شد که علاوه بر افزایش خاصیت آنتی‌باکتریال به دلیل کاهش ابعاد، منجر به کاهش قیمت تمام‌شده آن نیز شد و می‌توان از این نانوذره به‌عنوان یک عامل ضدباکتری در تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید بهره برد.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله از حمایت‌های مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی (IAUPS) تشکر و قدردانی می‌شود.
تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
تعارض منافع: تعارض منافعی وجود ندارد.
سهم نویسندگان: الهام عبدالمجید (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۵۰%)؛ فهیمه نعمتی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۵۰%)
منابع مالی: هزینه‌های پژوهش منتج به این مقاله از هزینه شخصی اینجانب *الهام عبدالمجید* تامین شده است.

منابع

1- Woodrow Wilson Database. 2014. Nanotechnology consumer product inventory. http://www.nanotechproject.org/ cpi/about/analysis/. Accessed September. 24, 2015.
2- Al-Salim NI, Bagshaw SA, Bittar A, Kemmtt T, Mcquillan AJ, Mills AM, et al. Characterization and activity of sol – gel prepared TiO2 photo catalysts modified with Ca, Sr or Ba ion additives. J Mater Chem. 2010;10:2358-63.
3- Venkatachalam N, Palanichamy M, Murugesan V. Sol-gel preparation and characterization of nanosize TiO2: Its photocatalytic performance. Mater Chem Phys. 2007;104(2-3):454-9.
4- Priyadarshini E, Pradhan N, Panda PK, Mishra BK. Biogenic unmodified gold nanoparticles for selective and quantitative detection of cerium using UV-vis spectroscopy and photon correlation spectroscopy (DLS). Biosens Bioelectron. 2015;68:598-603.
5- Reddy KM, Manorama SV, Reddy AR. Bandgap studies on anatase titanium dioxide nanoparticles. Mater Chem Phys. 2003;78(1):239-45.
6- Ali SW, Rajendran S, Joshi M. Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. Carbohydr Polym. 2011;83(2):438-46.
7- Gupta SM, Tripathi M. A review of TiO_2 nanoparticles. Chin Sci Bull. 2011;56(16):1639-57.
8- Gan Q, Wang T, Cochrane C, McCarron P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. Colloids Surf B Biointerfaces. 2005;44(2-3):65-73.
9- Yien L, Zin NM, Sarwar A, Katas H. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. Int J Biomater. 2012;2012:632698.
10- Wu MM, Chiou HY, Wang TW, Hsueh YM, Wang IH, Chen CJ, et al. Association of blood arsenic levels with increased reactive oxidants and decreased antioxidant capacity in a human population of northeastern Taiwan. Environ Health Perspect. 2001;109(10):1011-7.
11- Chen Z, Meng H, Xing G, Chen Ch, Zhao Y, Jia G, et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. Toxicol Lett. 2006;163(2):109-20.
12- Revell PA. The biological effects of nanoparticles. Nanotechnol Percept. 2006;2:283-98.

www.SID.ir