

TİTANYUM DİOKSİT NANOPARÇACIKLARININ YAC-1 LENFOMA HÜCRE SOYU CANLILIĞI VE İNCE YAPISI ÜZERİNE ETKİLERİ

THE EFFECTS OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES ON VITALITY AND ULTRASTRUCTURE OF YAC-1 LYMPHOMA CELL LINE

Tuğba KOTİL , Aslı ERDOĞAN , Hasan Serdar MUTLU , Sibel DOĞAN ,
Seyhun SOLAKOĞLU 

ÖZET

Amaç: Yaygın kullanım alanı olan nanoparçacıkların kanser terapisinde etkili oldukları bilinmektedir. Çalışmamızda geniş kullanım alanına sahip titanyum dioksit nanoparçacıklarının (TiO₂-NP) YAC-1 lenfoma hücre soyu üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: 24'lü kültür kuyucuklarına ekilen YAC-1 lenfoma hücreleri üzerine iki (0,1mg/mL, 0,5mg/mL) farklı konsantrasyonda TiO₂-NP'si uygulandı. 24 ve 48 saat sonra hücreler toplanarak canlılık testi için sayma kamerasında sayım yapıldı ve nicel farklılık Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testi ile belirlendi. Elektron mikroskop incelemesi için rutin takip sonrası Epon-812 ortamına gömülen hücrelerden alınan ince kesitler geçirimli elektron mikroskobu ile incelendi.

Bulgular: YAC-1 hücrelerinin çoğalma indekslerinde TiO₂-NP'lerin dozuna ve uygulama süresine bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma izlendi. Elektron mikroskopik incelemede, 24. saatte 0,5mg uygulanmış grupta ve 48. saatte 0,1 ve 0,5 mg uygulanmış grupta mitokondri bozulması, otofajik vakuol birikimi ve hem nekrotik hem de apoptotik hücre morfolojilerine rastlandı.

Sonuç: TiO₂-NP'lerinin farklı kanser hücre soyları üzerinde hücre ölümünü tetiklediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Çalışmamızda hücre çoğalma indeksi açısından doza ve süreye bağlı azalmaya ek olarak elektron mikroskopik olarak nanoparçacığa maruz kalan hücrelerde TiO₂-NP içeren otofajik vakuol oluşumları, organellerin yapısında bozulmalar ve apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü gösteren morfolojik değişimleri izledik. Çevremizde sürekli etkileşim halinde olduğumuz bu TiO₂-NP'sinin hücre üzerinde gösterdiği bu sitotoksik etkinin mekanizmaları, kapsamlı araştırmaların konusu olarak değerlendirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Nanoparçacık, titanyum dioksit, YAC-1, otofajik, apoptoz

ABSTRACT

Objective: Nanoparticles, which are widely used, are known to be effective in cancer therapy. The aim of this study is to investigate the effects of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NP) on the YAC-1 lymphoma cell line.

Materials and Methods: TiO₂-NP were applied at two different concentrations (0.1mg/mL, 0.5mg/mL) on cultured YAC-1 lymphoma cells in 24 well plates. After 24 and 48 hours of treatment the cells were collected and counted for viability test and the quantitative difference was determined by the Tukey-Kramer multiple comparison test. Cells were embedded in Epon-812 after routine process for the electron microscope examination. Thin sections of the cells were examined with Jem Jeol transmission electron microscope.

Cite this article as: Kotil T, Erdoğan A, Mutlu HS, Doğan S, Solakoğlu S. The effects of titanium dioxide nanoparticles on vitality and ultrastructure of Yac-1 lymphoma cell line. J Ist Faculty Med 2018; 81(1): 17-24.

Dergiye geldiği tarih/Date received: 02.01.2018 – **Dergiye kabul edildiği tarih/Date accepted:** 07.02.2018

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
(İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: tubakotil@msn.com)

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi Cilt / Volume: 81 • Sayı / Number: 1 • Yıl/Year: 2018

Results: The proliferation index of YAC-1 cells showed a statistically significant decrease with the dose and time dependent of TiO₂-NP treatment. Mitochondrial degeneration, autophagic vacuole accumulation and both necrotic and apoptotic cell morphologies were observed in both TiO₂-NP treatment groups via electron microscopic evaluation.

Conclusion: Several studies have shown that TiO₂-NPs trigger cell death on different cancer cell lines. In our study, we observed autophagic vacuole filled with NPs, organelle degeneration, and morphological changes showing apoptotic and necrotic cell death in groups exposed to nanoparticles. In addition significant decrease of proliferation index were detected with dose- and time-dependent. We are constantly interacting with TiO₂-NP in our daily day life. The mechanisms of these cytotoxic effects of TiO₂-NP should be elucidated by further studies.

Keywords: Nanoparticles, titanium dioxide; YAC-1; autophagy, apoptosis

GİRİŞ

Nanoteknoloji, boyutları 100 nm'den küçük olan nanometre ölçeğindeki materyalin üretimini, fiziksel ve kimyasal özelliklerini ve işlevlerini araştıran tekniktir (1). Nanoparçacıkların (NP), günlük yaşamda yaygın kullanım alanı bulmaktadır ve bu durum partiküllere maruz kalma düzeyini artırır (2). Titanyum dioksit düşük sitotoksik etkileri olduğu düşünülen bir parçacıktır. Boya, tekstil, kağıt, plastik, güneş koruyucu, kozmetik, diş macunu, yemek ürünleri gibi geniş kullanım alanı bulunan TiO₂ beyaz bir pigmenttir (3). Uluslararası kanser araştırma ajansı TiO₂'i Grup 2 kanserojen olarak sınıflandırmıştır (4). Öte yandan, nanoparçacıklar ve TiO₂'in bir başka kullanım alanı da kanser terapisisidir. Kanser tedavisinde tek başlarına ya da çeşitli antikanser ilaçları ile birlikte kullanılmaktadır. Bu amaçla nano taşıyıcı olarak kullanılan nanoparçacıkların, ilaç reaktivitesini, dayanıklılığını, elektriksel özelliklerini değiştirme özellikleri bulunmaktadır (5).

Nanoparçacıkların antitümoral etki mekanizmaları, reaktif oksijen türevlerinin (ROT) üretimi, apoptoz ya da nekroz yolu ile olabilir. Farklı metal oksit NP'lerinin normal hücrelerde herhangi bir etki göstermezken kanser hücrelerinde sitotoksiteyi uyardığı gösterilmiştir (6). Çalışmamızın amacı oldukça geniş kullanım alanı olan titanyumdioksit nanoparçacıklarının (TiO₂-NP) YAC-1 lenfoma hücre soyu üzerindeki olası sitotoksik etkilerini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda anataz/rutil kristal fazda ve 150 nm'den küçük boyutta nanoparçacıklar ve Moloney murine lösemi virüsü (Mo-MuLV, Manassas, Virginia, ABD) ile uyarılmış mus musculus kökenli YAC-1 lenfoma hücreleri kullanıldı. Bu çalışmada uygulanan tüm prosedürler, ulusal ve kurumsal komitelerin etik standartlarına ve 2008 yılında revize edilen Helsinki Deklarasyonu 1975 ile uyumludur.

Hücre Kültürü Çalışması

Hücreler 75cm² lik kültür şişelerinde DMEM medyumunu (Sigma, St. Louis, Missouri, ABD) ile süspansiyon halinde kültüre edilerek 37°C etüvde (Sanyo MCO-20AIC, Osaka, Japonya), %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. Hücreler 24'lü kültür kuyucuklarına mililitrede 100.000 hücre olacak şekilde ekildi. TiO₂-NP (Sigma Aldrich Cas number 13463-67-7, St. Louis, Missouri, ABD) iki farklı derişimde (0,1mg/mL ve 0,5mg/mL) olacak şekilde deney gruplarında kullanılacak medyuma eklendi ve nanoparçacıkların kümelenmesini engellemek için 30 dakika boyunca vorteks ile çalkalandı. 24 ve 48 saat sonrası hücreler toplanarak canlılık ve elektron mikroskopu çalışması için hazırlandı. Canlılık çalışması için hücreler santrifüj ile çevrilerek sayma kamarasında sayım yapıldı.

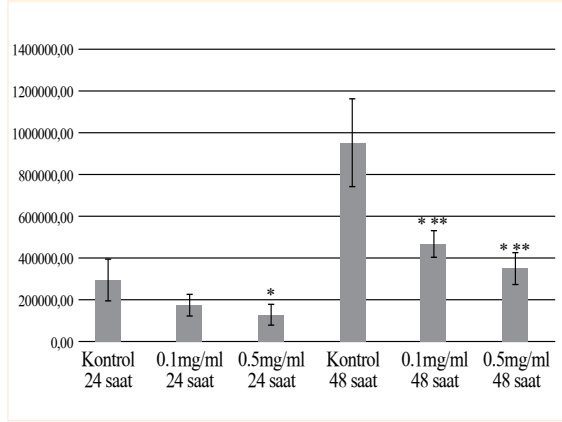
Elektron mikroskop çalışması

Hücreler santrifüj ile çevrildi, pellet halindeki hücreler %2,5'lik glutraldehit ile 1 saat süreyle tespit edildi. Fosfat tampon ile yıkama sonrası ozmik asit ile 1 saat +4 derecede ikincil tespit gerçekleştirildi. Yükselen aseton serilerinden geçirilen hücreler kapsül içinde epon plastik ortamına (Fluka-45359, St. Louis, Missouri, ABD) gömüldü. Kapsüller epon polimerizasyonu için inkübatörde (Heraeus B-5042, Hanau, Almanya) 60 derecede 18 saat inkübe edildi. Ultramikrotom (Leica EM UC7, Wetzlar, Almanya) ile alınan ince kesitler 100 meshlik bakır gridler üzerine alındı. Kesitler uranil asetat ve kurşun nitrat ile kontrastlama sonrası JEM Jeol 1011-B geçirimli elektron mikroskopu (Massachusetts, Amerika Birleşik Devletleri) ile incelendi. Görüntüler Megaview III dijital kamera kullanılarak Soft Imaging System (SIS) Analysis programı ile elde edildi.

İstatistiksel Analiz

Canlılık testi için gruplar arası anlamlılık olup olmadığını belirlemek üzere elde edilen verilen SPSS programın-

Effects of titanium dioxide nanoparticles' on YAC-1 lymphoma cell line



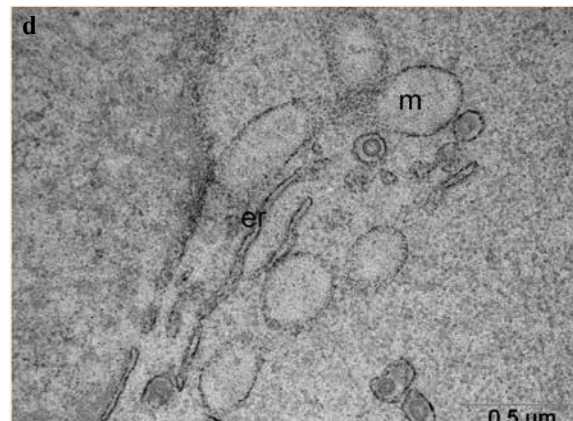
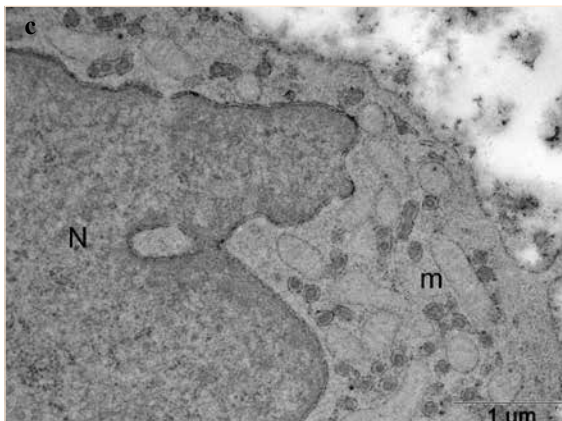
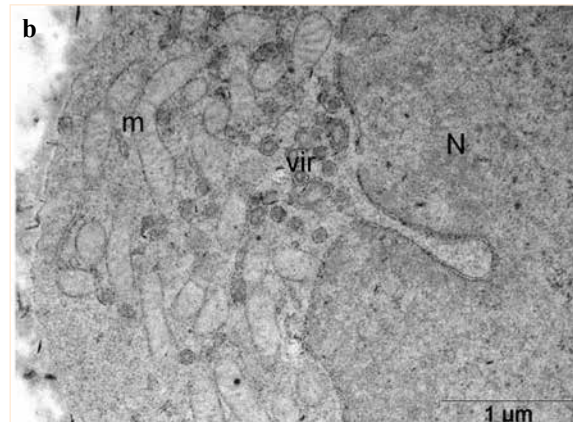
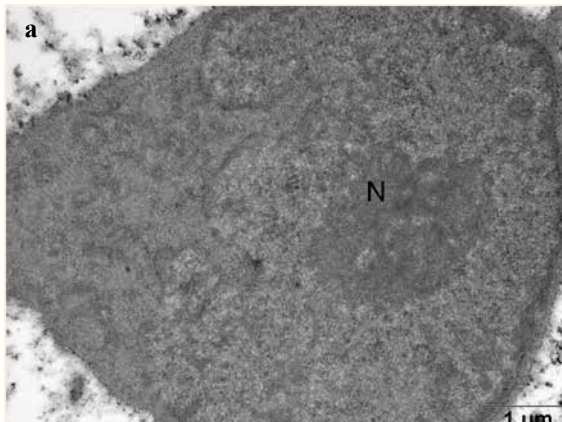
Resim 1: *: $p < 0,05$, 24 saat kontrol (K/24) ve 24 saat 0,5mg/mL (0,5/24) arasında anlamlı fark; *: $p < 0,001$, 48 saat kontrol (K/48) ve 48 saat 0,1mg/mL ve 0,5mg/mL (0,1/48, 0,5/48) arasında yüksek seviyede anlamlı fark**

da (IBM, New York, Amerika Birleşik Devletleri) Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi.

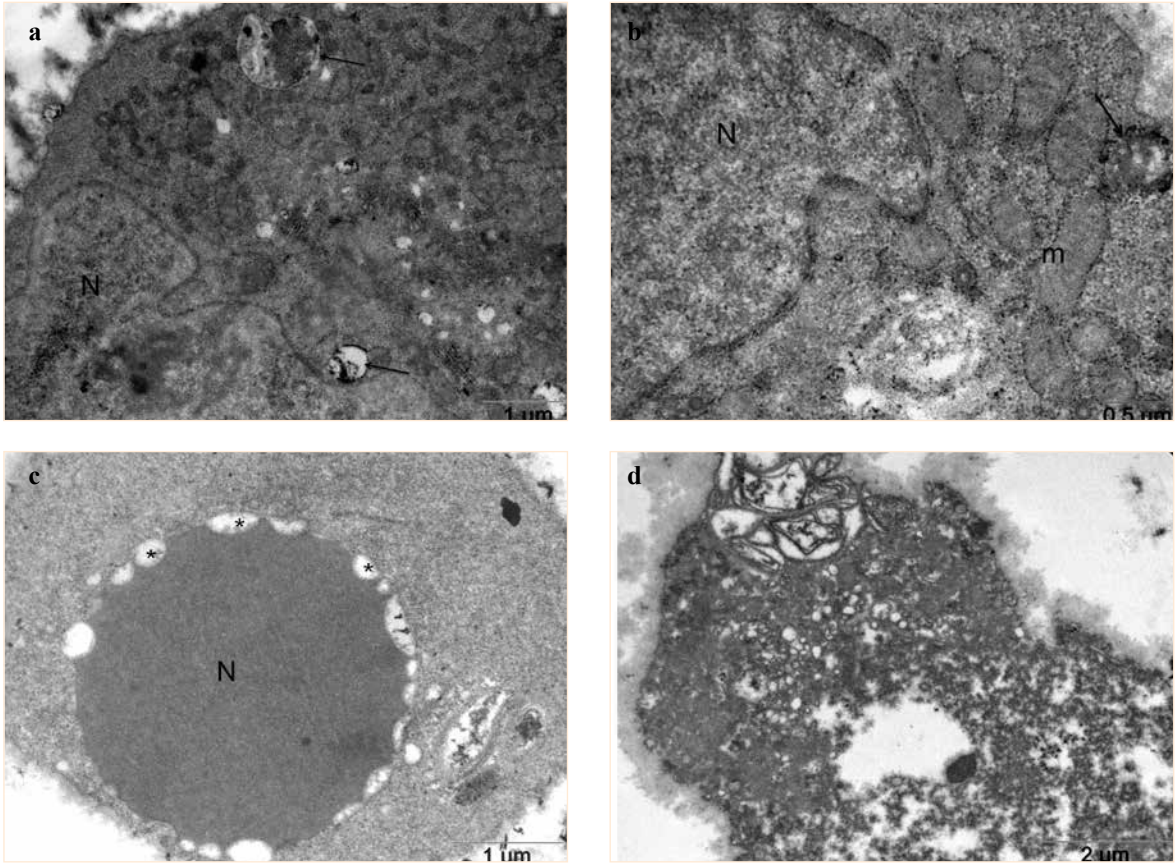
BULGULAR

Yirmi dördüncü saatte kontrol ve 0,1 mg/mL grubu arasında çoğalma indeksinde fark bulunmazken ($p > 0,05$) kontrol ve 0,5mg/mL grubu arasında anlamlı fark ($p < 0,05$) görüldü. Kırk sekizinci saatte, kontrol grubu ile 0,1 ve 0,5 mg/mL'lik gruplar arasında çoğalma indeksindeki düşüş çok yüksek seviyede anlamlı ($p < 0,001$) görüldü. Her iki deney grubu arasında hem 24. saatte hem de 48. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p > 0,05$) görülmedi (Resim 1).

Elektron mikroskopik incelemede hem 24. hem de 48. saate ait kontrol gruplarındaki hücreler oval ya da yuvarlak şekilli idi. Çekirdek zarı ve nükleer porlar belirgindi. Kromatin materyali kenarda heterokromatik alanların eşlik ettiği ökromatik özellikteydi. Çekirdekçik belirgindi. Sitoplazma



Resim 2 a-d. Kontrol grubuna ait hücrelerin elektron mikroskopik görüntüleri; 24 saatte Yac-1 Lenfoma hücresi genel görünümü (a); 48 saatte sitoplazmada Moloney Murine lösemi virüsü ve bol miktarda mitokondri (b-c) ve GER ve mitokondri (d) belirgin olarak izleniyor.



Resim 3 a-d. 0,1mg/mL TiO₂-NP uygulanmış gruba ait hücrelerin elektron mikroskop görüntüleri; 24 saat TiO₂-NP uygulanmış hücre dışında plazma membranına yakın konumda ve sitoplazmasında NP içeren vakuoller izleniyor (a-b), 48 saat TiO₂-NP uygulanmış hücre sitoplazmasında NP içeren vakuoller ve perinuklear aralıkta genişleme (yıldız) izleniyor (c), 48. saatte sitoplazma içeriği dejenere olmuş nekrotik hücre görüntüsü (d).

içerisinde lenfositleri lenfoma hücrelerine dönüştürmek üzere uygulanan Moloney murine lösemi virusu izlendi. Sitoplazmada mitokondri yoğunluğu fazlaydı ve mitokondrinin kristası belirgindi. (Resim 2 a-d).

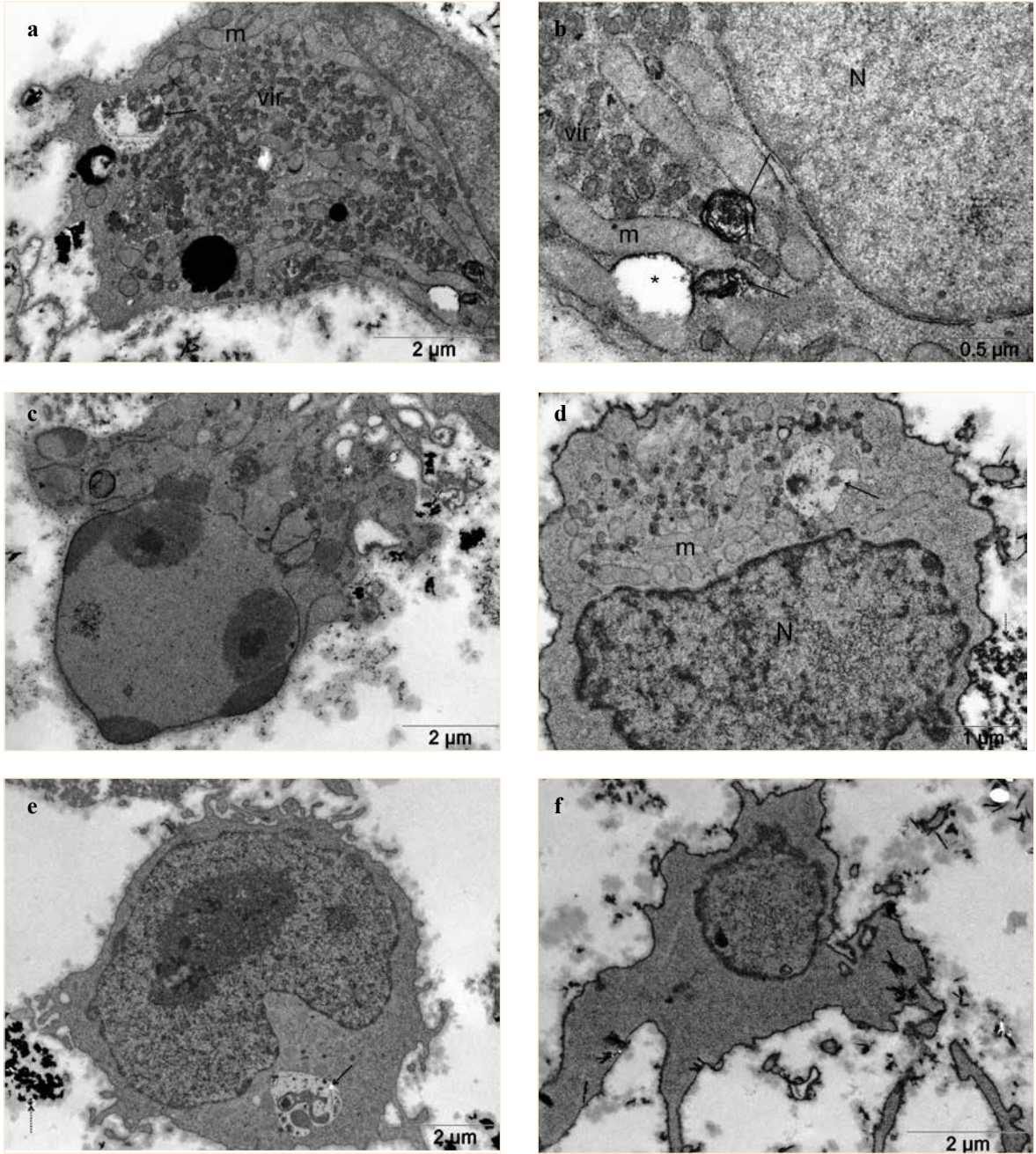
0.1mg/mL TiO₂-NP uygulanan hücrelerde 24 saatte kromatin materyali ve çekirdek zarında herhangi bir değişiklik izlenmedi. Sitoplazma içerisinde TiO₂-NP bulunan değişken boyutta vakuoller mevcuttu. Kırk sekiz saatlik grupta bazı hücrelerde genetik materyalin aşırı yoğun olduğu ve perinuklear aralıkta açılmaların bulunduğu izlendi. Sitoplazmada organeller belirgin izlenmiyordu. Ayrıca sitoplazma içerisinde nanoparçacık içeren vakuoller mevcuttu. Bütünlüğünü halen koruyan hücrelerin yanı sıra plazma zarı parçalanmış, nekrotik hücrelere de rastlandı. Bu hücrelerin sitoplazmasında TiO₂-NP'lerini içeren büyük vakuoller vardı. Sitoplaz-

mada yapısı bozulmuş ve krista kaybına uğramış mitokondri ve TiO₂-NP içeren çeşitli boyutlarda vakuollere rastlandı (Resim 3 a-d).

0.5mg/mL TiO₂-NP uygulanan hücreler incelendiğinde sitoplazmada TiO₂-NP birikimi içeren otofajik vakuoller mevcuttu. Mitokondri zarlarında ayrılma ve krista kaybı izlendi. Hücrelerde büzüşme mevcuttu. Bazı hücrelerde nükleer kondansasyon, mitokondri dejenerasyonu ve sitoplazmada kabarcık oluşumu ile ayırt edilen apoptotik hücre ölümünün tetiklenmiş olduğu görüldü. Sitoplazmada çevresinde nanoparçacık birikimine ayrıca NP içeren otofajik vakuollere de rastlandı (Resim 4 a-f).

TARTIŞMA

TiO₂-NP'leri hücreye özgün toksisite gösterir. TiO₂-NP'lerinin insan keratinosit HaCat hücreleri üzerindeki etkileri



Resim 4 a-f. 0,5mg/mL TiO₂-NP uygulanmış gruba ait hücrelerin elektron mikroskop görüntüleri;24. saatte sitoplazmada NP içeren vakuoller ve mitokondri hasarı (yıldız) izlenmekte (a-b), kondanse ve periferik genetik materyali ve bleb oluşumları ile apoptotik hücre morfolojisi izleniyor (c), 48. saatte hücre yüzeyinde ve sitoplazmasında NP birikimleri izleniyor (d-e), 48 saat TiO₂-NP uygulanması sonrası büzüşmüş hücre görünümü (f). N: nukleus, m: mitokondri, ER: endoplazma retikulumu, ok: nanoparçacık içeren otofajik vakuol, kesikli ok: sitoplazma dışındaki nanoparçacık kümesi, vir: virüs, yıldız: dejenere alanlar.

incelendiğinde hücre canlılığının doza bağlı olarak düştüğü ve ROT üretiminin arttığı bildirilmiştir (7). Thevenot ve ark. (8) farklı konsantrasyonlarda TiO_2 -NP'leri ile çeşitli tipte hücreler üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmada TiO_2 -NP'leri en yüksek doz olan 10mg/mL'de 3T3 fibroblast hücrelerinde sitotoksik etki göstermemiştir. Fakat prostat tümör hücresi (JHU) ve Lewis akciğer karsinom (LLC) hücrelerinde 10mg/ml konsantrasyonda %50 ve %75 oranında hücre ölümüne sebep olduğu bildirilmiştir. İnsan monoblastoid hücrelerinde TiO_2 -NP'lerinin yüksek konsantrasyonlarda 24. ve düşük konsantrasyonlarda 48. saatte nekrozu tetiklediği bildirilmiştir (9). Çalışmamızda hücre canlılığı üzerine elde ettiğimiz bulgular önceki çalışmalar ile uyumludur. TiO_2 -NP'lerinin fibrosarkom hücreleri üzerinde Bax/Bak aracılı apoptotik yolağa bağlı olarak hücre ölümünü tetiklediği bildirilmiştir (10). Gümüş nanoparçacıklarının Dalton lenfoma hücrelerinde kaspaz 3 aktivasyonunu tetikleyerek antitumoral aktivite gösterdiği bilinmektedir (11). TiO_2 -NP'lerinin hücre sitoplazmasına klatrin ve kaveolin aracılı endositoz ile girdiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (12). Sarhan ve Hussein'in yaptıkları çalışmada (13) Ag-NP'lerinin endositoz ile karaciğer Kupffer hücreleri içerisine alındığı endozom ve lizozomlardaki elektron mikroskopik görüntüleri ile bildirilmiştir. Titanyum dioksit gibi metal oksit nanoparçacıklarının diğer nanoparçacıklara göre otofaji oluşturmada daha etkili oldukları bilinmektedir. Bunun nedeni hücrelerde oksidatif stres ve katyonik hasarı artırma özelliklerine bağlıdır. Lopes ve ark. (14) yaptıkları çalışmada TiO_2 -NP'leri ile muamele edilen HaCat hücrelerinde filopod oluşumu ve 24. saat ve sonrasında ise sitoplazmanın her yerinde ve perinükleer alanın çevresinde otofagozomlar ile sarılı NP birikimlerine rastladıklarını bildirmişlerdir. Geçirimli elektron mikroskobu ile yapılan incelemede TiO_2 -NP'lerinin beyin endotel hücrelerinde sitoplazma içerisinde küçük ve büyük endozom ve lizozomlarda biriktiği ve otofajiyi tetikledikleri bildirilmiştir (15). Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak TiO_2 -NP'leri uygulanmış olan gruplarda hücrelerin sitoplazmalarında otofajik vakuollerin içerisinde TiO_2 -NP'lerinin birikmiş olduğunu gördük. Otofaji, duruma bağlı olarak hücrenin yaşamına devam etmesini sağlayabileceği gibi hücreyi ölüme de götürebilen bir süreçtir. Otofaji çift zarlı otofagozomların oluşması ve sonrasında lizozomlar ile birleşerek oluşturulan otofagolizozomlarda içeriğin asit hidrolazlar ile parçalanmasıdır. Oksidatif stres, açlık, DNA hasarı, mitokondri hasarı gibi stres durumlarında otofaji hücrenin

canlılığını sürdürebilmesi için girdiği bir süreçtir. Bu durumda otofaji ile elde edilen amino asit ve yağ asitleri yeni protein ve ATP üretimi için kullanılır ve hücre yaşamaya devam etmeye çalışır (16,17,18). Otofaji, hücrenin kendisini strese karşı savunma mekanizması olarak görünse de stresin fazla miktarda olması veya uzun süre devam etmesi durumunda hücre ölümüne sebep olabilir ve ayrıca uyarıya ve hücre tipine bağlı olarak apoptoz ya da nekroz gibi hücre ölüm tiplerini tetikleyebilir (19). Otofaji hücrelerin yaşadıkları mikro çevreye gelen ve bir stres unsuru olan nanoparçacıkları ortadan kaldırmak üzere verdikleri bir tepki olabilir. Bununla birlikte ortamda aşırı nanoparçacık varlığı hücreyi aşırı zorlayarak otofaji kaynaklı hücre ölümünü tetikleyebilir (16,20). Biz çalışmamızda hücrelerde nanoparçacık içeren otofajik vakuol birikimlerinin yanında doza bağlı olarak hücrelerde nekrotik ve apoptotik hücre ölümlerine ait bulgulara rastladık. Çalışmamızda kullandığımız TiO_2 -NP'leri immün sisteme ait olan lenfoma hücrelerinde hücre savunma süreci olan otofaji üzerinden farklı çeşitlilikte hücre ölümleri tetikleyebilir. Wang ve ark. (21) A549 hücrelerinde in vitro TiO_2 -NP uygulamasının hücre canlılığını azalttığını ve apoptotik cisim oluşumunu tetiklendiğini bildirmişlerdir. Yapılan diğer çeşitli çalışmalarda da TiO_2 -NP'lerinin BEAS-2B hücrelerinde (22), kemirgen mikrogliya N9 hücrelerinde (23) ve fare epidermal JB6 hücre soyunda (24) konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı ve apoptozu tetiklediği bildirilmiştir. Vamanu ve ark. (9) TiO_2 -NP'lerinin U937 hücreleri üzerindeki olası toksik etkilerini incelerken nükleer fragmentasyon, zarlarda kabarcık oluşumu, kromatin kondansasyonu gibi apoptotik modifikasyonların yanı sıra en düşük doz uygulamalarında hücre şişmesi, nükleer decondansasyon ve hücre parçalanması gibi nekrotik hücre ölümü bulgularına rastladıklarını da bildirmişlerdir. Bulgularımız bu çalışmalarda elde edilmiş sonuçlar ile uyumludur.

SONUÇ

TiO_2 -NP'leri günlük hayatımızda yaygın olarak kullanılmakta ve çevremizi ve bizi dolaylı ve doğrudan etkilemektedir. Lenfoma hücreleri üzerinde çalışmamızda hücre düzeyinde toksik etki gösteren düşük dozların hücre döngüsü üzerindeki etkilerini hangi mekanizma ile gerçekleştirdiği yeni çalışmalarla aydınlatılması gereken bir soru olarak kabul edilebilir.

Etik Komite Onayı: Yazarlar çalışmanın World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles

Effects of titanium dioxide nanoparticles' on YAC-1 lymphoma cell line

for Medical Research Involving Human Subjects”) prensiplerine uygun olarak yapıldığını beyan etmişlerdir.

Hasta Onamı: Çalışmamız deney hayvanı ya da klinik insan çalışması olmadığı ve in vitro kültür ortamında YAC-1 lenfoma hücre soyu kullanılarak yapıldığı için hasta onamı gerekmemektedir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – T.K., A.E., H.S.M., S.D., S.S.; Tasarım – T.K., A.E., H.S.M., S.D., S.S.; Denetleme – T.K., A.E., H.S.M., S.D., S.S.; Kaynaklar – S.D.; Malzemeler – S.D.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – T.K., A.E., H.S.M., S.D.; Analiz ve/veya Yorum – T.K., A.E., H.S.M.; Literatür Taraması – T.K.; Yazıyı Yazan – T.K.; Eleştirel İnceleme – T.K., S.S.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Ethics Committee Approval: Authors declared that the research was conducted according to the principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki “Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects”.

Informed Consent: Informed consent is not necessary since our study was performed using the YAC-1 lymphoma cell line in vitro and conducted neither on animals nor as a clinical trial.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – T.K., A.E., H.S.M., S.D., S.S.; Design – T.K., A.E., H.S.M., S.D., S.S.; Supervision - T.K., A.E., H.S.M., S.D., S.S.; Resources – S.D.; Materials – S.D.; Data Collection and/or Processing – T.K., A.E., H.S.M., S.D.; Analysis and/or Interpretation - T.K., A.E., H.S.M.; Literature Search - T.K.; Writing Manuscript - T.K.; Critical Review - T.K., S.S.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

REFERENCES

1. Bajaj VK, Goyal A, Sharma G, Sharma KB, Gupta RS. Synthesis of CdS nanoparticle and reveal its effect

- on reproductive system of male Albino rats. *BioNanoSci* 2013;3(1):58-66. [\[CrossRef\]](#)
2. Zhang X, Li W, Yang Z, Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update. *Arch Toxicol* 2015;89(12):2207-2217. [\[CrossRef\]](#)
3. Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J, Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol* 2013;10:15 [\[CrossRef\]](#)
4. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2006. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 86.).
5. Bharali DJ, Khalil M, Gurbuz M, Simone TM, Mousa SA. Nanoparticles and cancer therapy: A concise review with emphasis on dendrimers. *Int J Nanomedicine* 2009;4:1-7.
6. Vinardell MP, Mitjans M. Antitumor activities of metal oxide nanoparticles. *Nanomaterials (Basels)* 2015;5(2):1004-21. [\[CrossRef\]](#)
7. Xue C, Wu J, Lan F, Liu W, Yang X, Zeng F, et al. Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. *J Nanosci Nanotechnol* 2010; 10(12):8500-7. [\[CrossRef\]](#)
8. Thevenot P, Cho J, Wavhal D, Timmons R.B, Tang L. Surface chemistry influence cancer killing effect of TiO₂ nanoparticles. *Nanomedicine* 2008;4(3):226-236. [\[CrossRef\]](#)
9. Vamanu CI, Cimpan MR, Hol PJ, Sornes S, Lie SA, Gjerdet NR. Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: Studies on a human monoblastoid cell line. *Toxicol in Vitro* 2008;22(7):1689-1896. [\[CrossRef\]](#)
10. Zhu Y, Eaton JW, Li C. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles preferentially induce cell death in transformed cell in a Bak/Bax- independent fashion. *PLoS ONE* 2012;7(11):1-11. [\[CrossRef\]](#)
11. Luo YH, Chang LW, Lin P. Metal-Based Nanoparticles and the Immune System: Activation, Inflammation, and Potential Applications. *BioMed Res Int* 2015;143720 [\[CrossRef\]](#)
12. Thurn KT, Arora H, Paunesku T, Wu A, Brown EMB, Doty C, et al. Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine* 2011;7(2):123-130. [\[CrossRef\]](#)
13. Sarhan OMM, Hussein RM. Effects of intraperitoneally injected silver nanoparticles on histological structures and blood parameters in the albino rat. *Int J Nanomedicine* 2014;9:1505-1517.
14. Lopes VR, Vesa Loitto V, Audinot JN, Bayat N, Gutleb AC, Cristobal S. Dose dependent autophagic effect of titanium dioxide nanoparticles in human HaCaT

- cells at non cytotoxic levels. *J Nanobiotechnology* 2016;14:22. [\[CrossRef\]](#)
15. Halamoda KB, Chapuis BC, Guney-Ayra S, Juillerat-Jeanneret L. Induction of oxidative stress, lysosome activation and autophagy by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells. *Biochem* 2012;441(3):813-821. [\[CrossRef\]](#)
 16. Chen Y, Azad MB, Gibson SB. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death and Differ* 2009;16(7):1040-52. [\[CrossRef\]](#)
 17. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005;115(10):2679-88 [\[CrossRef\]](#)
 18. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *Journal Pathol* 2010;221(1):3-12. [\[CrossRef\]](#)
 19. Krysko DV, Kaczmarek A, Vandenabeele P. Molecular Pathways of Different Types of Cell Death: Many Roads to Death. *Phagocytosis of Dying Cells: From Molecular Mechanisms to Human Diseases*; 2009:p.3-31.
 20. Azad MB, Chen Y, Gibson SB. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. *Antioxid Redox Signal* 2009;11(4):777-90. [\[CrossRef\]](#)
 21. Wang Y, Cui H, Zhou J, Li F, Wang J, Chen M, et al. Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Environ Sci Pollut Res Int* 2015;22(7):5519-30. [\[CrossRef\]](#)
 22. Parka EJ, Yib J, Chungc KH, Ryud DY, Choie J, Park K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett* 2008;180(3):222-9. [\[CrossRef\]](#)
 23. Li XB, Xu SQ, Zhang ZR, Schluesener HJ. Apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured murine microglia N9 cells. *Chinese Sci Bull* 2009;54(20):3830-36. [\[CrossRef\]](#)
 24. Zhao J, Bowman L, Zhang X, Vallyathan V, Young SH, Castranova V, et al. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce JB6 cell apoptosis through activation of the caspase-8/Bid and mitochondrial pathways. *J Toxicol Environ Health A* 2009;72(19):1141-9. [\[CrossRef\]](#)