بررسی اثرات فتوکاتالیتیکی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید دوپه شده با نیتروژن در مهار رشد و القاء آپوپتوز در سلولهای K562 لوسمی انسان

<u>سید محمد امین موسوی</u> [،]، علیرضا ختائی^۲، سروش مؤسسغفاری ^۳

۱. استادیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (مؤلف مسؤول)، تلفن: moosav_m@tabrizu.ac.ir ۰۴۱۱-۳۳۹۲۷۴۱ ۲. استادیار، گروه شیمی کاربردی، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز، ایران

۳. کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیدہ

زمینه و هدف: نانوذرات تیتانیوم دیاکسید (TiO₂) اثرات ضد سرطانی قابل توجهی در چندین ردهی سلولی سرطانی نشان دادهاست. نانو TiO₂ یک فتوکاتالیست مهم به شمار میآید که فقط در معرض نور فرابنفش (UV) فعال می گردد. اخیراً، تلاش ها یی جهت بهبود خاصیت فتوکاتالیتیکی TiO₂ با ایجاد تغییرات سطحی در جریان است. در این میان عنصر نیتروژن می تواند به عنوان یک عامل مناسب جهت افزایش فعالیت فتوکاتالیتیکی این نانوذره حائز اهمیت باشد. در این مطالعه، برای اولین بار اثرات مهار رشدی و القاء آپوپتوزی TiO₂ دوپه شده با نیتروژن (N-TiO₂) در ردهی سلولی K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی لوسمی میلوئید مزمن (CML) و مقایسهی آن با TiO₂ دوپه نشده در هر دو شرایط تاریکی و در معرض نور مرئی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: نانوذرات N-TiO₂ (۸۰ نانومتر) با مخلوط کردن مکانیکی اوره با پودر TiO₂ تحت شرایط ویژه ی آزمایشگاهی تهیه و مشخصات آن توسط میکروسکوپ الکترونی گزاره (TEM)، انکسار اشعه ی X (XRD) و آنالیزهای BET (Brunauer–Emmett–Teller) تأئید شد. رده ی سلولی K562 پس از کشت تحت تأثیر نانو ذرات N-TiO₂ در غلظتها و فواصل زمانی مختلف قرار گرفت. از آزمون دفع رنگ تریپان بلو به منظور بررسی رشد و زیستائی در سلولهای K562 استفاده شد. برای بررسی نوع مرگ سلولی از الکتروفورز DNA به کمک ژل آگارز استفاده گردید.

یافته ها: نتایج نشان داد که N-TiO₂ تحت تأثیر نور مرئی سبب مهار رشد و زیستائی در سلول های K562 به صورت وابسته به زمان و غلظت گردید. به عنوان مثال N-TiO₂ در ۴۸ ساعت و در غلظت های ۱۰/۰، ۱، ۱، ۵ و ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر سبب مهار رشد سلول های K562 به ترتیب به میزان ۲۵٪،۳۴٪، ۳۹٪، ۴۶٪ و ۴۷٪ و کاهش زیستائی به ترتیب ۱۱٪، ۲۲٪، ۳۰٪، ۳۵٪ و ۳۸٪ گردید. نتایج حاصل از آزمون قطعه قطعه شدن DNA مؤید وقوع مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در سلول های K562 تیمار شده بود. در حالیکه TiO₂ دوپه نشده هیچ گونه اثری بر رشد و زیستائی این سلول ها نشان نداد.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه N-TiO₂ باعث القاء اثرات ضدسرطانی از طریق مهار رشد و القاء آپوپتوز در سلولهای K562 می گردد، این نانوذره می تواند به عنوان یک کاندیدای بالقوه برای مطالعات بیشتر در درمان فتو کاتالیتیکی CML مورد توجه قرار گیرد.

> **کلمات کلیدی:** آپوپتوز، K562، تیتانیوم دی اکسید دو په شده با نیتروژن ، فتو کاتالیست وصول مقاله :۹۰/۸/۱۴ اصلاحیه نهایی: ۹۱/۳/۲۲ پذیرش:۹۱/۳/۳۰

بازترکیبی این نانوذرات با ایجاد سطوح جدید الکترونی در جريان است. تاكنون چندين فتوكاتاليست TiO₂ دويه شده با فلزات و نافلزات ٔ سنتز شدهاند که با ایجاد نقص در شبکهی TiO2 قادر به کاهش انرژی شکاف باند در این نانو ذرات شده اند (۱۱). دویه کردن فلزات با TiO₂ اغلب به دلیل طول عمر کوتاه ناقل های ایجاد شده باعث کاهش خصلت فتوكاتاليتيكي مي شود (١١). مطالعات صورت گرفته نشان دادهاند که دویه کردن نافلزاتی از قبیل نیتروژن (N)، کربن (C)، گوگرد (S) و فلوئور (F) با TiO₂ سبب کاهش خصلت بازترکیبی و بهبود فعالیت فتوكاتاليتيكي اين نانوذره تحت نور مرئي، با طول موج بيشتر از ۴۰۰ نانومتر مي شوند (۱۵–۱۲). از ميان اين نافلزات، نیتروژن به دلیل دارا بودن انرژی یونیزاسیون کم، اندازهای مشابه اندازهی اکسیژن و پایداری بالا حائز اهمیت می باشد. TiO₂ دویه شده با نیتروژن (N-TiO₂) برای اولین بار توسط Asahi و همکارانش در سال ۲۰۰۱ میلادی سنتز شد (۱۲). در ساختار ایجاد شده یونهای نیتروژن جایگزین یونهای اکسیژن در شبکهی TiO₂ شده و یک سطح انرژی جدید در شکاف باند TiO₂ پدید می آورند که سبب كاهش خصلت باز تركيبي الكترون- حفره مي شود N- تاکنون روش های متفاوتی برای تهیهی نانوذرات TiO₂ به کار گرفته شده است که شامل روش های فیزیکی و شیمیائی میباشند. روشهای شیمیائی سادهتر وارزانتر بوده و شامل رسوبگذاری نانوذرات TiO2 تحت منابع نیتروژن از قبیل آمونیاک و اوره میباشد. از آنجا که آمونیاک ترکیبی فرار بوده و بخشی از آن طی فرآیند رسوبگذاری قبل از واکنش، تبخیر می شود و نیز بخشی از آمونیاک جذب شده ممکن است در دمای ۳۰۰K تجزیه گردد. به علاوه مولکولهای آمونیاک ممکن است با جایگاههای خالی

⁴ Metal and non-metal doped TiO₂ photocatalyst

مقدمه

نانوذرات تیتانیوم دی اکسید (TiO₂) یکی از مهمترین و يركاربرد ترين فتوكاتاليستها به شمار مي آيد. نانو TiO₂ به دلیل دارا بودن خواص فتو کاتالیتیکی قوی از قبیل خصلت اکسیداتیو بالا و پایداری نوری به همراه مزیتهای دیگری مانند عدم سمیت، ارزان بودن و در دسترس بودن به عنوان یک کاتالیست فعال نوری منحصر به فرد مطرح شده و به طور وسیع در زمینههای مختلف از جمله پاکسازی و استرلیزاسیون آب، حذف آلودگی از هوا و نیز در سلولهای خورشیدی بکار برده شده است(۳-۱). اخیراً خواص بيولوژيكي اين نانو ذرات، بويژه فعاليت ضد سرطاني آن ها مورد توجه محققان قرار گرفته است. به عنوان مثال اثرات ضد سرطانی نانو ذرات TiO2 در انواع متفاوتی از سلولهای سرطانی از قبیل سلولهای بنیادی مزانشیمال (۴)، لمفوبلاستوئید (۵)، سلول های سرطان سینه (۶) و ریه (۷) مشاهده شده است. الکترونهای موجود در لایهی ظرفیت فتو کاتالیستهای TiO₂ در حضور نور فرابنفش (UV) با طول موج کمتر از ۴۰۰ نانومتر، برانگیخته میشوند. در نتيجهي اين برانگيختگي جفت الكترن-حفره پديد میآیدکه قادر به القاء استرس اکسیداتیو از طریق تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) از قبیل آنیون سویر اکسید (O_2) ، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH) میباشد (۸). اما به هر حال، یکی از مشكلات مهم اين نانوذرات سطح بالاي انرژي شكاف باند" (۳/۲ الکترون ولت برای ایزوتوپ آناتاز TiO₂) و در نتیجه برانگیختگی توسط نور UV و امکان بازترکیبی الکترون-حفره میباشد (۹، ۱۰). از اینرو، تلاشهای بسیاری جهت بهبود فعالیت فتو کاتالیتیکی TiO₂ و کاهش خواص

¹ Ultraviolet light

² Reactive oxygen species

³ Band gap energy

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره هجدهم /بهار۱۳۹۲

N- در اتانول معلق شده، سپس به مدت TEM ابتدا پودر -N TiO₂ در اتانول معلق شده، سپس به مدت ۱۵ دقیقه تحت نوسان اولتراسونیک Sonorex Bandelin Digi Tec, روی یک UK) قرار گرفت. آنگاه یک قطره از آن بر روی یک شبکهی مسی پوشیده شده با یک لایه از کربن آمورف قرار داده شد. مساحت سطحی بر اساس مدل BET در یک رنج فشار نسبی ۹/۰- ۲۰/۰ محاسبه شد. برای تعیین ترکیب فاز N- فشار نسبی ۹/۰- ۲۰/۰ محاسبه شد. برای تعیین ترکیب فاز Siemens X-ray XRD در یک رادج (Siemens X-ray XRD اندازه گیری های GF7 اندازه اتاق صورت گرفت. ولتاژ ۴۰ کیلو ولت و جریان نشر ۳۰ میلی آمپر استفاده شد. اندازهی متوسط کریستال های این کاتالیست مطابق فرمول Debye–Scherrer محاسبه شد (۲۲).

تهیهی استو ک N-TiO₂ و TiO₂

N- ابتدا استوک ۵/۰ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوذرات -N TiO₂ در محیط کشت RPMI 1640 تهیه شد. سپس جهت حذف تجمعات^۷ نانوذرات، سوسپانسیون حاصل به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه تحت نوسان اولتراسونیک قرار گرفت. نهایتاً ۲۵۶ تا ۶۰ درصد حجمی- حجمی به عنوان عامل نهایتاً FBS ۱۰ درصد حجمی- حجمی به عنوان عامل پایدار کننده سوسپانسیون^۸ افزوده شد و پس از تهیهی رقتهای موردنظر جهت تیمار سلولی مورد استفاده قرار گرفت. 2iO دوپه نشده نیز با روش مشابه تهیه شد.

کشت سلول

ردهی سلولی K562 از بانک سلولی ایران خریداری شد. سلولها در محیط کشت RPMI 1640 دارای سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰ درصد حجمی-حجمی، آنتی بیوتیکهای استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) و پنی سیلین CO₂ (۱۰۰ U/ml) (سیناژن-ایران) در انکوباتور با شرایط اکسیژن میان کنش داده و دسترسی به جایگاههای ⁺Ti⁴ را محدود کنند و سبب کاهش سطح ویژهی نانوذرات شوند. بنابراین در این مطالعه نانوذرات 20 N-TiO به روش رسوب گذاری با اوره تهیه شد تا از اثرات کاهش سطح ویژهی ذرات جلو گیری شود (۱۷، ۱۸). تا کنون اثرات نانوذرات N-TiO2 در چندین نوع قارچ و باکتری نشان داده شده است (۱۹، ۲۰) و با دانش ما فقط یک مطالعه در ارتباط با اثرات ضدسرطانی آن صورت گرفته است (۲۱). این مطالعه به منظور بررسی اثرات ضدسرطانی N-TiO2 و Sort دوپه نشده در ردهی سلولی K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی لوسمی میلوئید مزمن (CML) صورت پذیرفت.

مواد و روش ها این مطالعه از نوع تجربی - آزمایشگاهی بوده است. تهیه ی نانوذرات N-TiO توسط مخلوط کردن مکانیکی نانوذرات N-TiO2 توسط مخلوط کردن مکانیکی اوره (Merck آلمان) با پودر 2002 - کره جنوبی) به اوره (Merck) آلمان) با پودر 2002 - کره جنوبی) به نسبت ۴ به ۱ تهیه شدند. ابتدا این مواد تحت اتمسفر هوا در دمای ۴۰۰ درجهی سانتیگراد با نرخ گرمایش ۱۰ درجهی سانتیگراد در دقیقه قرار گرفته، سپس تا دمای اتاق سرد شدند. پس از خرد کردن در آون، پودر زرد رنگ سبک وزنی بدست آمد که اندازه ی کریستالهای آن ۸۰ نانومتر و مساحت سطح ویژهاش g /۸۲ m² بود. این مشخصات توسط میکروسکوپ الکترونی گزاره^ه (MET)، انکسار اشعهی X[°] (MRD) و آنالیز های:

⁷ Aggregate

⁸ Dispersion stabilizer

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره هجدهم /بهار۱۳۹۲

⁵ Transmission electron microscopy

⁶ X-ray diffraction

۵ ٪، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت مورد تعویض قرار گرفت. برای انجام آزمایشات، پاساژ ۴ یا ۵ سلولها پس از کشت سلولی و رسیدن به فاز تصاعدی بکار گرفته شد. بررسی ریخت شناسی سلولی

به منظور بررسی اثرات نانوذرات N-TiO₂ بر تغییرات ریخت شناسی سلولهای K562، تعداد ^۹،۱ سلول درپلیت ۲۴ چاهکی (SPL life science - کره جنوبی) قرار داده شد. سلول ها با غلظتهای مختلف N-TiO₂ (۱۰/ ۰، ۱/۰، ۱، ۵، ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) در تاریکی تیمار شدند. سپس به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در معرض لامپ تنگستن ۱۰۰ وات قرار گرفت. از فیلتر ۴۰۰ نانومتر جهت منگستن ۱۰۰ و ۸۸ ساعت تغییرات ریختشناسی سلول های تیمار شده و تیمار نشده (کنترل) با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus-ژاپن) مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای بررسی رشد و زیستایی سلولی از آزمون دفع رنگ تریپان بلو استفاده شد. بدین منظور، تعداد ۲۰۴×۴ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ چاهکی با غلظت های ۲۰/۰ تا ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از N-TiO2 و TiO2 دوپه نشده در شرایط تاریکی تیمار شد. سپس در معرض نور مرئی در حضور فیلتر ۴۰۰ نانومتر به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه قرار گرفت. پس از گذشت ۶، ۱۲، ۲۴و ۴۸ ساعت، تعداد سلول-های هر چاهک با استفاده از هموسایتومتر و رنگ تریپان بلو (Sigma - آمریکا) مورد سنجش قرار گرفت (۲۳).

بررسی قطعه قطعه شدن DNA [،]

برای بررسی قطعه قطعه شدن DNA ازالکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید، بدین منظور تعداد ^۱۰۰×۵ سلول با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر N-TiO₂ تیمار شد. پس

از سانتریفوژ، سلولها با ۲۰ میکرولیتر بافر لیز کننده شامل (EDTA ^{۱۰} EDTA ^{۱۰} SDS ^{۱۰} SDS ^{۱۰} ۸/۰ درصد وزنی – -Merck)(pH= ۸ میلی مولار، ۸ =pH)(PH آلمان) لیز و سپس ۱۰ میکرولیتر ۲۲۱۹ RNase ۹/۲۱ و پروتئیناز X (Fermentas میکرولیتر المان) هر کدام بطور جداگانه افزوده شد ودر ۵۰ درجهی سانتیگراد به مدت یک شبانه روز قرار گرفت. پس از افزودن ۵ میکرولیتر بافر لودینگ ×۶ (٪۳۰ گلیسرول و ٪۲۵ بروموفنول بلو) ،هر یک از نمونه -های موجود در چاهکهای ژل آگارز ۱۵/۵ درصدی بارگذاری شد. با انجام الکتروفورز قطعات DNA از هم جدا شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند .

روش آماری

تمامی دادههای بدست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بوده و دادهها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2003 وآزمون آماری Student-*t-test* مورد تجزیه و تحلیل آماری معنی دار تلقی و دادههای با ارزشP<۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار تلقی شدند.

یافته ها

ميكروسكوپ TEM

تصویر بدست آمده از میکروسکوپ TEM در شکل ۱ آمده است. بر اساس فرمول Debye– Scherrer اندازهی متوسط کریستالهای نانوذرات ۸۰ N-TiO₂ نانومتر محاسبه شد.





¹⁰ Ethylenediamine tetraacetic acid¹¹ Sodium dodecyl sulfate

⁹ DNA fragmentation

ممِله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره همِدهم /بهار۱۳۹۲

طيف XRD

مطابق شکل ۲ پیکهای XRD بدست آمده یک پیک بزرگ در ۲۵/۳^۵ و پیکهای کوچک در ۵۵/۱^۵ و ۴۸/۱^۵، ۴۸/۱^۵، ۲۷/۸^۰ تا نشان میدهد که حاکی از آناتاز بودن نانوذرات است. اثرات فتوکاتالیتیکی آناتاز بیش از سایر فرمهای کریستالی بوده لذا این فرم برای بررسی اثرات فتوسیتوتوکسیسیتی^{۱۱} این نانوذرات مناسبتر است.





N-TiO₂ سبب ایجاد تغییرات ریختشناسی در سلولهای K562 می گردد مشاهدات میکروسکوپ نوری نشان دهندهی وقوع تغییرات ظاهری چشمگیری در سلولهای تیمار شده با N-TiO₂ تابیده شده با نور مرئی میباشد (شکل۳). در ۶ و ۱۲ ساعت پس از تیمار با N-TiO₂ چسبندگی سلولی مشاهده شد. با گذشت زمان(۲۴ و ۴۸ ساعت) غشای سلولهای K562 تیمار شده با N-TiO₂ چروکیده شده و اجسام کوچکی شبیه اجسام آپوپتوتیک شکل گرفتند.

شکل ۳- تغییرات ظاهری سلولهای K562 تیمار شده با N-TiO₂. پس از تیمار سلولها با۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر N-TiO₂ به مدت ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت خصوصیات ظاهری آن ها با استفاده از میکروسکوپ نوری با درشت نمائی ۴۰x مورد بررسی قرار گرفت. چسبندگی سلولی با پیکان سفید و چروکیدگی غشاء و تشکیل اجسام آپوپتوتیک با پیکان سیاه نمایش داده شده اند



¹² Photocytotoxicity

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره هجدهم /بهار۱۳۹۴

N-TiO₂ سبب مهار رشد و زیستائی در سلولهای K562 می گردد

اثر غلظتهای متفاوت N-TiO₂ در رشد و زیستائی سلول-های K562 در فواصل زمانی مختلف، در حضور و در غیاب نور مرئی بررسی شد. همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می شود N-TiO₂ تابیده شده با نور مرئی سبب مهار رشد و زیستائی در سلولهای K562 به صورت وابسته به غلظت می گردد. به عنوان مثال K562 به صورت وابسته به غلظت می گردد. به عنوان مثال K562 به ترتیب به میزان در غلظتهای ۱۰/۰، ۱/۰، ۱، ۵ و ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر سبب مهار رشد سلولهای K562 به ترتیب به میزان زیستائی به ترتیب ۱۱٪، ۲۲٪ (نمودار ۱- الف) و کاهش رو ۲۸٪ گردید(نمودار ۱- ب). به علاوه، همانطور که در نمودار ۲ بر N-TiO₂ بر مهاری N-TiO₂ بر

رشد و زیستائی این سلولها به صورت وابسته به زمان نیز مشاهده شد بطوریکه غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر -N TiO2 تحت تأثیر نور مرئی و در فواصل زمانی ۶، ۱۲، ۲۴، و ۴۸ ساعت سبب مهار رشد سلولهای K562 به ترتیب به میزان ۲۸٪، ۳۳٪، ۳۸٪ و ۴۷٪ و مهار زیستائی به ترتیب به میزان ۲۱٪، ۲۶٪، ۳۳٪ و ۴۸٪ شد. غلظت ۱۰ میکرو گرم بر میزان ۲۱٪، ۲۶٪، ۳۳٪ و ۳۸٪ شد. غلظت ۱۰ میکرو گرم بر میزان ۲۱٪، ۲۶٪، ۳۳٪ و ۳۵٪ شد. غلظت ۱۰ میکرو گرم بر میزان ۲۱٪، ۲۶٪، ۳۰٪ و ۳۵٪ شد. غلظت ۱۰ میکرو گرم بر میزان ۲۱٪، ۲۰٪ و ۳۸٪ گردید(نمودار ۲ الف و ب). ساعت سبب مهار رشد و زیستائی در سلولهای TiO2 دوپه ترتیب به میزان ۴۷٪ و ۳۸٪ گردید(نمودار ۲ الف و ب). نشده هیچ کدام اثرقابل توجهی بر مهار رشد و زیستائی در سلولهای K562 نشان ندادند (نمودار ۲ ج و د).

نمودار ۱-اثرات N-TiO2 بر رشد و زیستانی سلولهای K562 تحت تابش نور مرئی. پس از تیمار سلولها با غلظتهای متفاوت N-TiO2 (۱۰- ۱۰/۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) و در فواصل زمانی ۶ ساعت (♦)، ۱۲ ساعت (□)، ۲۴ ساعت (▲) و ۴۸ ساعت (O) درصد مهار رشد (الف) و زیستایی سلولها (ب) با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو مطابق مواد و روش ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج از سه آزمایش مستقل و حاصل سه بار تکرار بوده و به صورت ± میانگین خطای استاندارد (SEM±) نمایش داده شده است. دادههای با 20.5 هماز نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شدند.

ب)

الف)





مجله علمی دانشگاه علوم یزشکی کردستان/ دوره هجدهم /بهار۱۳۹۳

نمودار ۲- اثرات N-TiO₂ و TiO₂ دوپه نشده بر رشد (الف و ج) و زیستائی (ب و د) سلول های K562 تحت تابش نور مرئی (الف و ب) و بدون تابش (ج و د). پس از تیمار سلول ها با N-TiO(♦) و TiO₂ دوپه نشده(□) (۱۰- ۱۰/۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۴۸ ساعت درصد مهار رشد (الف) و زیستایی سلولها (ب) با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفت. نتایج از سه آزمایش مستقل و حاصل سه بار تکرار می باشند. داده ها به صورت ± میانگین خطای استاندارد (SEM) نمایش داده شده و داده های با 20.5 = از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شدند.



شاخصهای وقوع مرگ سلولی آپوپتوزی در سلولهای K562 میباشد. لازم به ذکر است که قطعه قطعه شدن DNA در سلولهای K562 در طی آپوپتوز حالت نردبانی^{۱۴}متداول را نشان نمیدهد.

¹³ Smear

می گردد

به منظور تعيين نوع مرگ سلولي القاء شده توسط N-TiO₂

از آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. باتوجه به

شکل ۴، مشاهدهی لکه" بر روی ژل آگارز در سلولهای

تیمار شده و عدم مشاهدهی آن در سلولهای کنترل، نشان-دهندهی قطعه قطعه شدن DNA به عنوان یکی از

د)

¹⁴ Ladder

مجله علمی دانشگاه علوم یزشکی کردستان/ دوره هجدهم /بهار۱۳۹۴

شکل ۴– بررسی اثرات آپوپتوزی N-TiO₂ بر قطعه قطعه شدن DNA در سلولهای K562 پس از تیمار سلولها با غلظت ۱۰میکروگرم بر میلی لیتر از N-TiO₂، اثرات آپوپتوزی این نانوذرات در ۴۸ ساعت با استفاده از الکتروفورز DNA به کمک ژل آگارز بررسی شد.



به شمار می آیند (۲۹). با پیشرفت های اخیر در زمینهی کاربرد نانوذرات در بیولوژی و به خصوص درمان سرطان، در جستجوی یافتن نانوذراتی که از طریق القای آپوپتوز عمل نموده و اثرات جانبی کمی داشته باشند در صدد برآمدیم تا اثرات فتو کاتالیست N-TiO₂ را در سلولهای K562 به عنوان مدل مناسبی برای فاز بلاست CML مورد بررسی قرار دهیم. در این مطالعه برای اولین بار نشان دادیم که نانوذرات N-TiO₂ تابیده شده با نور مرئی سبب مهار رشد و زیستائی به صورت وابسته به غلظت و زمان در سلول-های K562 گردیدند. جالب توجه اینکه، TiO₂ دوپه نشده هیچ گونه اثری بر این سلولها نشان نداد. برخی بررسیها عدم تأثیر پذیری سلولهای K562 را نسبت به TiO₂ تأئید کردهاند (۳۰، ۳۱). در این مطالعه نشان داده شد که زیستائی سلولهای K562 پس از ۲۴ ساعت تیمار با N-TiO₂ ۱۰ µg/ml در معرض نور مرئی به حدود ۶۰ درصد کاهش یافت در حالیکه مطالعهی صورت گرفته بر سلول های Hela نشان میدهد که غلظت بالاتراین نانو ذرات (۵۰ μg/ml) سبب کاهش زیستائی به همین مقدار بحث

در مطالعهی حاضر نانوذرات N-TiO₂ به روش رسوب گذاری با اوره به عنوان منبع نیتروژن که روشی ساده و ارزان است تهیه گردید. از آنجا که اوره بر خلاف سایر منابع نیتروژن از قبیل آمونیاک فاقد اثرات کاهشی بر سطح ویژهی نانوذرات TiO₂ میباشد، لذا نانوذرات بدست آمده در این مطالعه دارای اثرات فتوکاتالیتیکی قوی تر (پس از ۱۵ دقیقه تابش با نور مرئی) نسبت به مطالعهی انجام شده توسط نانوذرات حاصل از روش رسوب گذاری با آمونیاک (یس از ۴ ساعت تابش با نور مرئی) بودند(۲۱). CML یک بیماری خونی میباشد که در اثر رشد کنترل نشده ی سلول های بنیادی/پیش ساز خونساز ایجاد می شود (۲۴). اگرچه تاکنون راهکارهای درمانی مختلفی از قبیل شیمی درمانی، پرتودرمانی، پیوند مغز استخوان، هدف درمانی و درمانهای ترکیبی برای درمان CML پیشنهاد شده است اما هیچ یک منجر به بهبودی کامل بیماری نگردیده است (۲۸-۲۵). اکثر داروهای شیمی درمانی از طریق القای آپوپتوز و یا مهار رشد عمل می کنند اما اثرات جانبی و مقاومت سلولهای توموری از مشکلات عمدهی این راهکار درمانی

ممِله علمي دانشگاه علوم پزشکي کردستان/ دوره همدهم /بهار۱۳۹۲

می شود. به علاوه مشابه نتایج بدست آمده از مطالعه ی ما، مطالعه ی صورت گرفته بر سه رده ی سلولی Hela، QGY کارسینومای هپاتوسلولار^{۱۵} و KB کارسینومای نازوفارنکس^{۱۹}، نشان می دهد که TiO₂ دو په نشده و-N نازوفارنکس^{۱۹}، نشان می دهد که TiO₂ دو په نشده و-N ملولها نیز نشان نمی دهند (۲۱). در مقایسه با نتایج ما،

سلولها نيز نشان نمىدهند (٢١). در مقايسه با نتايج ما، چندین مطالعه اثرات ضدسرطانی TiO₂ دویه نشده و دویه شده با دیگر عناصر را در سلولهای سرطانی نشان دادهاند. به عنوان مثال، اثرات مهار رشدی نانوذرات TiO₂ در سلول های L-02 و Bel-7402 هیاتوسیت انسانی به ترتیب پس از ۴۸ و ۹۶ ساعت نشان داده شده است (۳۲). در حالبکه در این مطالعه، نشان داده شد که N-TiO₂ سبب مهار رشد در سلول های K562 پس از مدت زمان کمتر (۴۸–۶ ساعت) می شود. به علاوه نتایج ما نشان داد که اثرات TiO₂ بر مهار زیستائی سلولهای K562 (پس از ۲۴ ساعت) بواسطهی القاء آيويتوز صورت مي گيرد. لازم به ذكر است كه در آزمون قطعه قطعه شدن DNA در سلولهای K562 تیمار شده با CBX به جای حالت نردبانی، حالت لکه مشاهده شد که می تواند به دلیل نقص در عملکرد آنزیم CAD ^{۱۷} که نقش اصلی را در برش بین نوکلئوزومی DNA در طول آیویتوز به عهده دارد، باشد (۳۴و ۳۳). مطالعات نشان دادهاند که هیاتوسیتهای انسانی L-02 تیمار شده با TiO₂ پس از گذشت مدت زمان بیشتری (۷۲ ساعت) مشخصات مرگ سلولی آپویتوز را نشان میدهند (۳۲). همچنین بررسیهای صورت گرفته توسط Lee و همکارانش حاکی از القاء آپویتوز در سلولهای H1299 سرطان ریه توسط غلظت بالای TiO₂ (۲۵۰ میکروگرم بر میلے, لیتر) می باشد (۷). مشابه مطالعه ی ما نشان داده شده که نانوذرات TiO₂ دویه شده با سریم ((Ce(IV)) در غلظت

۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر سبب القاء آپویتوز در سلولهای Bel-7402 هیاتومای انسانی پس از گذشت ۲۴ ساعت می گردد (۳۵). از آنجا که اختلال در فرآیند آپویتوز به عنوان یک عامل مهم در فرآیند سرطانی شدن به شمار مى آيد، لذا القاى آيويتوز توسط نانوذرات N-TiO₂ مي تواند به عنوان يک راهکار مورد توجه در درمان CML مطرح گردد. امروزه، خواص فتوکاتالیتیکی نانوذرات TiO₂ تحت تأثیر نور UV به خوبی شناخته شده است. اما چون نور UV برای بدن مضر بوده و از سوی دیگر گونه های ROS تولید شده توسط TiO₂ تابیده شده با نور UV طول عمر بسیار کوتاهی دارند، نانوذرات TiO₂ قادر به القای طولانی مدت اثرات ضد سرطانی نمی باشند (۳۶). از اینرو لزوم ارائهی نانوذراتی مانند N-TiO₂ با دارا بودن خواص فتوكاتاليتيكي بيشتر و بازتركيبي كمتر كه قادر به برانگیختگی الکترونی تحت تأثیر نور مرئی باشند، پیشنهاد می شود. مکانیسم اثرالقای آیویتوزی نانوذرات N-TiO₂ در سلولهای K562 ممکن است بواسطهی گونههای ROS توليد شده صورت گيرد. اين گونه ها با ايجاد استرس اکسیداتیو سبب القای آپویتوز در این سلولها می گردند. با افزایش زمان تیمار و با تولید گونههای ROS بیشتر، تعداد بيشتري از سلولها دستخوش فرآيند آپويتوز مي شوند. اينكه کدام گونههای ROS تولید شده توسط نانوذرات -N TiO₂ سبب القای آیویتوز می شوند، نیازمند مطالعات بیشتر مى باشد.

ممله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره همدهم /بهار۱۳۹۳

¹⁵ Hepatocellular carcinoma cells

¹⁶ Nasopharyngeal carcinoma cells

¹⁷ Caspase activated DNA

تشكر و قدرداني

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را ازمعاونت پژوهشی دانشگاه تبریز که هزینههای قسمتی از طرح را متقبل نموده اند ابراز میدارند. نتيجه گيري

با توجه به اثرات مهار رشدی و القای آپوپتوزی نانوذرات N-TiO₂ در سلول.های K562 لوسمی انسانی، این نانوذرات مي توانند به عنوان يک کانديداي ويژه براي مطالعات بعدی در درمان فتوکاتالیتیکی لوسمی مورد توجه قرار گېرند.

References

1. Reddy BM, Ganesh I, Khan A. Stabilization of nanosized titania-anatase for high temperature catalytic applications. J Mol Catal A Chem 2004; 223: 295-304.

2. Fujishima A, Zhang X. Titanium dioxide photocatalysis: present situation and future approaches. C R Chemie 2006; 9: 750-60.

3. Kasem KK, Dahn M. Photodissociation of water using colloidal nanoparticles of doped titanium (IV) oxide semiconductors for hydrogen production. Curr Sci 2010; 99: 1068-73.

4. Wang ML, Tuli R, Manner PA, Sharkey PF, Hall DJ, Tuan RS. Direct and indirect induction of apoptosis in human mesenchymal stem cells in response to titanium particles. J Orthop Res 2003; 21: 697–707.

5. Wang JJ, Sanderson BJ, Wang H. Cyto- and geno-toxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. Mutat Res 2007; 628: 99-106.

6. Lagopati N, Kitsiou PV, Kontos AI, Venieratos P, Kotsopoulou E, Kontos AG and et al. Photo-induced treatment of breast epithelial cancer cells using nanostructured titanium dioxide solution. J Photochem Photobiol A 2010; 214: 215-23.

7. Lee YS, Yoon S, Yoon HJ, Lee K, Yoon HK, Lee JH and et al. Inhibitor of differentiation 1 (Id1) expression attenuates the degree of TiO₂-induced cytotoxicity in H1299 non-small cell lung cancer cells. Toxicol Lett 2009; 189: 191-9.

8. Rahmani AR, Samarghandi MR, Samadi MT, Nazemi F. Photocatalytic disinfection of coliform bacteria using UV/TiO₂. J Res Health Sci 2009; 9: 1-6.

9. Khataee AR, Fathinia M, Aber S, Zarei M. Optimization of photocatalytic treatment of dye solution on supported TiO₂ nanoparticles by central composite design: Intermediates identification. J Hazard Mater 2010; 181, 886-97.

10. Khataee AR, Zarei M, Fathinia M, Khobnasab Jafari M. Photocatalytic degradation of an anthraquinone dye on immobilized TiO₂ nanoparticles in a rectangular reactor: destruction pathway and response surface approach. Desalination 2011; 268:126–33.

11. Zaleska A. Characteristics of doped- TiO₂ photocatalysts. Physicochem Probl Mi 2008; 42: 211-22.

12. Asahi R, Morikawa T, Ohwaki T, Aoki K, Taga Y. Visible-light photocatalysis in nitrogen-doped titanium oxides. Science 2001; 293: 269-71.

13. Sakthivel S, Kisch H. Daylight photocatalysis by carbon-modified titanium dioxide. Chem Int Ed 2003; 42: 4908-11.

14. Umebayashi T, Yamaki T, Yamamoto S, Miyashita A, Tanaka S, Sumita T and et al. Sulfur-doping of rutile-titanium dioxide by ion implantation: Photocurrent spectroscopy and first-principles band calculation studies. J Appl Phys 2003; 93: 5156-60.

15. Ho W, Yu JC, Lee S. Synthesis of hierarchical nanoporous F-doped TiO_2 spheres with visible light photocatalytic activity. Chem Commun 2006;14: 1115-7.

16. Huan YU, Xuxu Z, Zhongyi Y, Feng T, Beibei F and Keshan H. Preparation of nitrogendoped Ti02 nanoparticle catalyst and its catalytic activity under visible light. Chin J Chern Eng 2007; 15: 802-7.

17. D Mitoraj, H Kisch. On the mechanism of urea-induced titania modification. Chem Eur J 2010; 16: 261-9.

18. E Farfan-Arribas, R J Madix. Characterization of the acid-base properties of the TiO_2 (110) surface by adsorption of amines. J Phys Chem 2003; 107: 3225-33.

19. Li M, Huang QZ, Qiu DF, JiaoZJ, Meng ZH, Shi HZ. Study on anti-fungal activity of nitrogen-doped TiO_2 nanophotocatalyst under visible light irradiation. Chin Chem Lett 2010; 21: 117- 21.

20. Liu Y, Li J, Qiu X, Burda C. Bactericidal activity of nitrogen-doped metal oxide nanocatalysts and the influence of bacterial extracellular polymeric substances (EPS). J Photochem Photobiol 2007; 190: 94-100.

21. Li Z, Mi L, Wang PN, Chen JY. Study on the visible-light-induced photokilling effect of nitrogen-doped TiO2 nanoparticles on cancer cells. Nanoscale Res Lett 2011; 6: 356-62. 22. Patterson A L. The scherrer formula for X-ray particle size determination. Phys Rev 1939; 56: 978–82.

23. Moosavi MA, Moasses Ghafary S, Asadi M, Asvadi Kermani I. Growth inhibitory and apoptotic effects of carbenoxolone in human leukemia K562 cell line. SJKU 2011; 16: 27-37.

24. An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding PR, Ashby Jr CR, Chen ZS. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review. Leuk Res 2010; 34:1255-68.

25. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM. Chronic Myelogenous Leukemia: Biology and Therapy. Ann Intern Med 1999; 131: 207-19.

26. Radivoyevitch T, Kozubek S, Sachs RK. Commentary the risk of chronic myeloid leukemia: can the dose–response curve be u-shaped? Radiat Res 2002; 157: 106-9.

27. Mauro MJ, Maziarz RT. Stem cell transplantation in patients with chronic myelogenous leukemia: when should it be used? Mayo Clin Proc 2006; 81: 404-16.

28. Fausel C. Targeted chronic myeloid leukemia therapy: Seeking a Cure. JMCP 2007; 13; S8-S12.

29. Bruserud O, Gjertsen BT. New strategies for the treatment of acute myelogenous leukemia: differentiation induction-present use and future possibilities. Stem Cells 2000; 18: 157-65.

30. Lazau C, Mocanu L, Miron I, Sfirloaga P, Tanasie G, Tatu C and et al. Consideration regarding the use of TiO_2 Doped nanoparticles in medicine. Dig J Nanomater Bios 2007; 2: 257-63.

31. Bregoli L, Chiarini F, Gambarelli A, Sighinolfi G, Gatti AM, Santi P and et al. Toxicity of antimony trioxide nanoparticles on human hematopoietic progenitor cells and comparison to cell lines. Toxicology 2009; 262: 121-9.

32. Xian- ying C, Hong- lian D, Yu- hua Y, Shi- pu L. Selective anti-hepatoma treated with titanium oxide nanoparticles In vitro. J Wuhan Univ Technol 2003; 18: 52-4.

33. Moosavi MA, Yazdanparast R , Sanati MH. The cytotoxic and anti-proliferative effects of 3-Hydrogenkwadaphnin in K562 and Jurkat cells is reduced by guanosine. J Bio Chem Mol Biol 2005; 38: 391-8.

34. Mirkina II, Mernenko OA, Satpaev DK, Karelin AA, Blishchenko EY. Cytolytic processes induced by TNF in L929 and K562 differ in DNA fragmentation mechanisms. Immunol Lett 1996; 52: 105-8.

35. Wang L, Mao J, Zhang GH, Tu MJ. Nano-cerium-element-doped titanium dioxide induces apoptosis of Bel 7402 human hepatoma cells in the presence of visible light. World J Gastroenterol 2007; 13: 4011-4.

36. Harada Y, Ogawa K, Irie Y, Endo H, Feril LB Jr, Uemura T and et al. Ultrasound activation of TiO_2 in melanoma tumors. J Control Release 2011; 149:190-5.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره هجدهم /بهار۱۳۹۲