مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره هجدهم /بهار۱۳۹۲ /۵۸-۴۷

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

سید محمد امین موسوی [۱]، علیرضا ختائی [۲]، سروش مؤسس‌غفاری [۳]

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

۲. استادیار، گروه شیمی کاربردی، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

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

چکیده

زمینه و هدف: نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید (TiO_2) اثرات ضد سرطانی قابل توجهی در چندین رده‌ی سلولی سرطانی نشان داده‌است. نانو TiO_2 یک فتوکاتالیست مهم به شمار می‌آید که فقط در معرض نور فرابنفش (UV) فعال می‌گردد. اخیراً، تلاش‌ها یی جهت بهبود خاصیت فتوکاتالیتیکی TiO_2 با ایجاد تغییرات سطحی در جریان است. در این میان عنصر نیتروژن می‌تواند 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 TiO_2 دوپه شده با نیتروژن ($N\text{-}TiO_2$) در رده‌ی سلولی K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی لوسمی میلوئید مزمن (CML) و مقایسه‌ی آن با TiO_2 دوپه نشده در هر دو شرایط تاریکی و در معرض نور مرئی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: نانوذرات $N\text{-}TiO_2$ (۸۰ نانومتر) با مخلوط کردن مکانیکی اوره با پودر TiO_2 تحت شرایط ویژه‌ی آزمایشگاهی تهیه و مشخصات آن توسط میکروسکوپ الکترونی گزاره (TEM)، انکسار اشعه‌ی X (XRD) و آنالیزهای BET (Brunauer–Emmett–Teller) تأئید شد. رده‌ی سلولی K562 پس از کشت تحت تأثیر نانو ذرات $N\text{-}TiO_2$ 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 الکتروفورزDNA به کمک ژل آگارز استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که $N\text{-}TiO_2$ تحت تأثیر نور مرئی سبب مهار رشد و زیستائی در سلول‌های K562 به صورت وابسته به زمان و غلظت گردید. به عنوان مثال $N\text{-}TiO_2$ در ۴۸ ساعت و در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر سبب مهار رشد سلول‌های K562 به ترتیب به میزان ۲۵٪،۳۴٪، ۳۹٪، ۴۴٪ 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 سلول‌های K562 تیمار شده بود. در حالیکه TiO_2 دوپه نشده هیچ گونه اثری بر رشد و زیستائی این سلول‌ها نشان نداد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه $N\text{-}TiO_2$ باعث القاء اثرات ضدسرطانی از طریق مهار رشد و القاء آپوپتوز در سلول‌های K562 می‌گردد، این نانوذره می‌تواند به عنوان یک کاندیدای بالقوه برای مطالعات بیشتر در درمان فتوکاتالیتیکی CML مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آپوپتوز،K562، تیتانیوم دی اکسید دوپه شده با نیتروژن ، فتوکاتالیست

وصول مقاله :۹۰/۸/۱۴ اصلاحیه نهایی: ۹۱/۳/۲۲ پذیرش:۹۱/۳/۳۰

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

مقدمه

نانوذرات تیتانیوم دی اکسید (TiO_2) یکی از مهمترین و پرکاربرد ترین فتوکاتالیست‌ها به شمار می‌آید. نانو TiO_2 به دلیل دارا بودن خواص فتوکاتالیتیکی 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 بیولوژیکی این نانو ذرات، بویژه فعالیت ضد سرطانی آن ها مورد توجه محققان قرار گرفته است. به عنوان مثال اثرات ضد سرطانی نانو ذرات TiO_2 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 فتوکاتالیست‌های TiO_2 در حضور نور فرابنفش[1] (UV) با طول موج کمتر از ۴۰۰ نانومتر، برانگیخته می‌شوند. در نتیجه‌ی این برانگیختگی جفت الکترن-حفره پدید می‌آیدکه قادر به القاء استرس اکسیداتیو از طریق تولید گونه‌های اکسیژن فعال[2] (ROS) از قبیل آنیون سوپراکسید (O_2^-)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) می‌باشد (۸). اما به هر حال، یکی از مشکلات مهم این نانوذرات سطح بالای انرژی شکاف باند[3] (۳/۲ الکترون ولت برای ایزوتوپ آناتاز TiO_2) و در نتیجه برانگیختگی توسط نور UV و امکان بازترکیبی الکترون-حفره می‌باشد (۹، ۱۰). از اینرو، تلاش‌های بسیاری جهت بهبود فعالیت فتوکاتالیتیکی TiO_2 و کاهش خواص بازترکیبی این نانوذرات با ایجاد سطوح جدید الکترونی در جریان است. تاکنون چندین فتوکاتالیست TiO_2 دوپه شده با فلزات و نافلزات[4] سنتز شده‌اند که با ایجاد نقص در شبکه‌ی TiO_2 قادر به کاهش انرژی شکاف باند در این نانوذرات شده‌اند (۱۱). دوپه کردن فلزات با TiO_2 اغلب به دلیل طول عمر کوتاه ناقل‌های ایجاد شده باعث کاهش خصلت فتوکاتالیتیکی می شود (۱۱). مطالعات صورت گرفته نشان داده‌اند که دوپه کردن نافلزاتی از قبیل نیتروژن (N)، کربن (C)، گوگرد (S) و فلوئور (F) با TiO_2 سبب کاهش خصلت بازترکیبی و بهبود فعالیت فتوکاتالیتیکی این نانوذره تحت نور مرئی، با طول موج بیشتر از ۴۰۰ نانومتر می شوند (۱۵-۱۲). از میان این نافلزات، نیتروژن به دلیل دارا بودن انرژی یونیزاسیون کم، اندازه‌ای مشابه اندازه‌ی اکسیژن و پایداری بالا حائز اهمیت می باشد. TiO_2 دوپه شده با نیتروژن ($N\text{-}TiO_2$) 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 TiO_2 شده و یک سطح انرژی جدید در شکاف باند TiO_2 پدید می‌آورند که سبب کاهش خصلت باز ترکیبی الکترون- حفره می شود (۱۶). تاکنون روش‌های متفاوتی برای تهیه‌ی نانوذرات N-TiO_2 به کار گرفته شده است که شامل روش‌های فیزیکی و شیمیائی می‌باشند. روش‌های شیمیائی ساده‌تر وارزانتر بوده و شامل رسوبگذاری نانوذرات TiO_2 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 می‌شود و نیز بخشی از آمونیاک جذب شده ممکن است در دمای ۳۰۰K تجزیه گردد. به علاوه مولکول‌های آمونیاک ممکن است با جایگاه‌های خالی

[1] Ultraviolet light
[2] Reactive oxygen species
[3] Band gap energy
[4] Metal and non-metal doped TiO_2 photocatalyst

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

اکسیژن میان‌کنش داده و دسترسی به جایگاه‌های Ti^{4+} را محدود کنند و سبب کاهش سطح ویژه‌ی نانوذرات شوند. بنابراین در این مطالعه نانوذرات $N\text{-}TiO_2$ به روش رسوب‌گذاری با اوره تهیه شد تا از اثرات کاهش سطح ویژه‌ی ذرات جلوگیری شود (۱۷، ۱۸). تا کنون اثرات نانوذرات $N\text{-}TiO_2$ 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 $N\text{-}TiO_2$ و TiO_2 دوپه نشده در رده‌ی سلولی K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی لوسمی میلوئید مزمن (CML) صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی-آزمایشگاهی بوده است.

تهیه ی نانوذرات $N\text{-}TiO_2$

نانوذرات $N\text{-}TiO_2$ توسط مخلوط کردن مکانیکی اوره (Merck–آلمان) با پودر TiO_2 Coteix KA- (anatase: >99% Coteix) 100 -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 اندازه‌ی کریستال‌های آن ۸۰ نانومتر و مساحت سطح ویژه‌اش ۹/۸۲ m^2/g بود. این مشخصات توسط میکروسکوپ الکترونی گزاره[5] (TEM)، انکسار اشعه‌ی X [6] (XRD) و آنالیز های: BET (Brunauer–Emmett–Teller) تأئید شد.

جهت مشاهده‌ی نمونه‌ی مورد نظر با TEM ابتدا پودر $N\text{-}TiO_2$ در اتانول معلق شده، سپس به مدت ۱۵ دقیقه تحت نوسان اولتراسونیک (Sonorex Bandelin Digi Tec, 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 ۰/۹- ۰/۰۵ محاسبه شد. برای تعیین ترکیب فاز کریستال و اندازه‌ی متوسط نانوذرات کریستالی $N\text{-}TiO_2$، اندازه گیری های XRD (Siemens X-ray diffraction D5000, Cu Kα radiation) در دمای اتاق صورت گرفت. ولتاژ ۴۰ کیلو ولت و جریان نشر ۳۰ میلی‌آمپر استفاده شد. اندازه‌ی متوسط کریستال‌های این کاتالیست مطابق فرمول Debye–Scherrer محاسبه شد (۲۲).

تهیه‌ی استوک $N\text{-}TiO_2$ و TiO_2

ابتدا استوک ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوذرات $N\text{-}TiO_2$ در محیط کشت RPMI 1640 تهیه شد. سپس جهت حذف تجمعات[7] نانوذرات، سوسپانسیون حاصل به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه تحت نوسان اولتراسونیک قرار گرفت. نهایتاً FBS ۱۰ درصد حجمی- حجمی به عنوان عامل پایدار کننده سوسپانسیون[8] افزوده شد و پس از تهیه‌ی رقت‌های موردنظر جهت تیمار سلولی مورد استفاده قرار گرفت. TiO_2 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 (۱۰۰U/ml) (سیناژن- ایران) در انکوباتور با شرایط CO_2

[5] Transmission electron microscopy
[6] X-ray diffraction
[7] Aggregate
[8] Dispersion stabilizer

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

۵ ٪، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت مورد تعویض قرارگرفت. 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 $N\text{-}TiO_2$ بر تغییرات ریخت شناسی سلول‌های K562، تعداد 10^5 سلول درپلیت ۲۴ چاهکی (SPL life science -کره جنوبی) قرار داده شد. سلول ها با غلظت‌های مختلف $N\text{-}TiO_2$ (۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵، ۱۰ میکروگرم 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 حذف امواج UV استفاده شد. در فواصل زمانی متفاوت ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت تغییرات ریخت‌شناسی سلول های تیمار شده و تیمار نشده (کنترل) با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus-ژاپن) مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی رشد سلولی

برای بررسی رشد و زیستایی سلولی از آزمون دفع رنگ تریپان بلو استفاده شد. بدین منظور، تعداد 4×10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ چاهکی با غلظت های ۰/۰۱ تا ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر از $N\text{-}TiO_2$ و TiO_2 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 [9]

برای بررسی قطعه قطعه شدن DNA ازالکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید، بدین منظور تعداد 5×10^5 سلول با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر $N\text{-}TiO_2$ تیمار شد. پس از سانتریفوژ، سلول‌ها با ۲۰ میکرولیتر بافر لیز کننده شامل (EDTA [10] ۱۰۰ میلی مولار، SDS [11] ۰/۸ درصد وزنی-حجمی، Tris-HCl ۲۰ میلی مولار، pH= ۸)(Merck-آلمان) لیز و سپس ۱۰ میکرولیتر RNase A/T1 و پروتئیناز K (Fermentas-آلمان) 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 ۱/۵ درصدی بارگذاری شد. با انجام الکتروفورز قطعات DNA از هم جدا شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند .

روش آماری

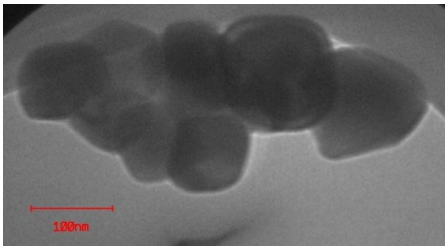
تمامی داده‌های بدست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بوده و داده‌ها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2003 وآزمون آماری Student-*t-test* مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و داده‌های با ارزش$P<0/05$ از نظر آماری معنی دار تلقی شدند.

یافته ها

میکروسکوپ TEM

تصویر بدست آمده از میکروسکوپ TEM در شکل ۱ آمده است. بر اساس فرمول Debye– Scherrer اندازه‌ی متوسط کریستال‌های نانوذرات $N\text{-}TiO_2$ ۸۰ نانومتر محاسبه شد.

شکل۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی $N\text{-}TiO_2$ (TEM)



[9] DNA fragmentation

[10] Ethylenediamine tetraacetic acid

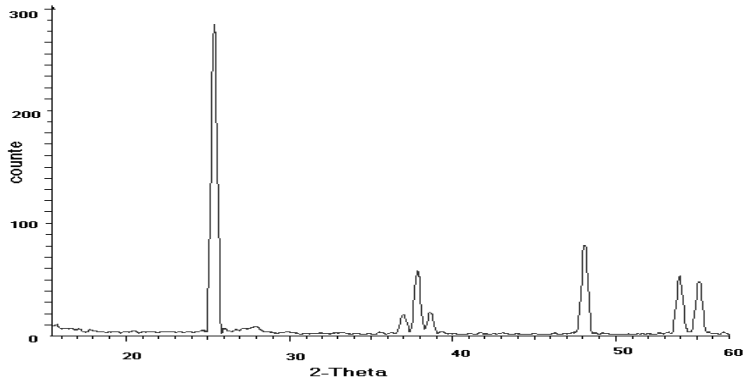
[11] Sodium dodecyl sulfate

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

طیف XRD

مطابق شکل ۲ پیک‌های XRD بدست آمده یک پیک بزرگ در $2\Theta = ۲۵/۳^{o}$ و پیک‌های کوچک در $۵۵/۱^{o}$ و $۵۳/۹^{o}$، $۴۸/۱^{o}$، $2\Theta=۳۷/۸^{o}$ را 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[12] این نانوذرات مناسبتر است.

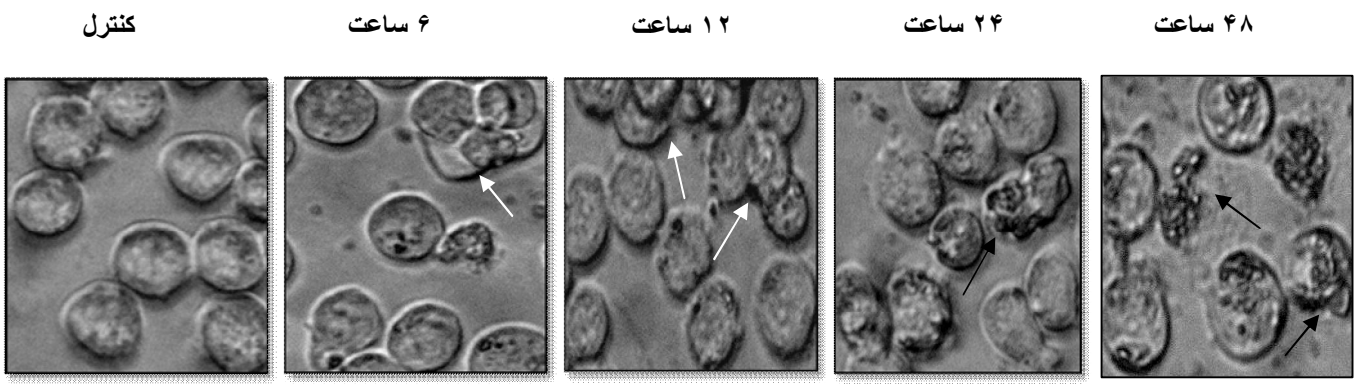
شکل ۲- پیک های حاصل از انکسار اشعه ی X (XRD) مربوط به $N\text{-}TiO_2$.



$N\text{-}TiO_2$ سبب ایجاد تغییرات ریخت‌شناسی در سلول‌های K562 می‌گردد

مشاهدات میکروسکوپ نوری نشان دهنده‌ی وقوع تغییرات ظاهری چشمگیری در سلول‌های تیمار شده با $N\text{-}TiO_2$ تابیده شده با نور مرئی می‌باشد (شکل۳). در ۶ و ۱۲ ساعت پس از تیمار با $N\text{-}TiO_2$ چسبندگی سلولی مشاهده شد. با گذشت زمان(۲۴ و ۴۸ ساعت) غشای سلول‌های K562 تیمار شده با $N\text{-}TiO_2$ چروکیده شده و اجسام کوچکی شبیه اجسام آپوپتوتیک شکل گرفتند.

شکل ۳- تغییرات ظاهری سلول‌های K562 تیمار شده با $N\text{-}TiO_2$. پس از تیمار سلول‌ها با ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر $N\text{-}TiO_2$ 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

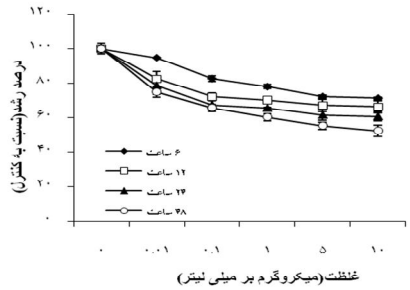
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

$N\text{-}TiO_2$ سبب مهار رشد و زیستائی در سلول‌های K562 می‌گردد

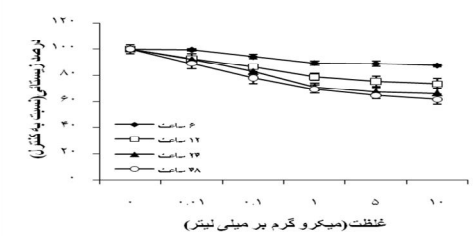
اثر غلظت‌های متفاوت $N\text{-}TiO_2$ در رشد و زیستائی سلول-های K562 در فواصل زمانی مختلف، در حضور و در غیاب نور مرئی بررسی شد. همانطور که در نمودار۱ مشاهده می شود $N\text{-}TiO_2$ تابیده شده با نور مرئی سبب مهار رشد و زیستائی در سلول‌های K562 به صورت وابسته به غلظت می‌گردد. به عنوان مثال $N\text{-}TiO_2$ در ۴۸ ساعت و در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر سبب مهار رشد سلول‌های K562 به ترتیب به میزان ۲۵٪،۳۴٪، ۳۹٪، ۴۴٪ و ۴۷٪ (نمودار ۱- الف) و کاهش زیستائی به ترتیب ۱۱٪، ۲۲٪، ۳۰٪، ۳۵٪ و ۳۸٪ گردید(نمودار ۱- ب). به علاوه، همانطور که در نمودار۲ (الف و ب) مشاهده می شود اثرات مهاری $N\text{-}TiO_2$ بر رشد و زیستائی این سلول‌ها به صورت وابسته به زمان نیز مشاهده شد بطوریکه غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر $N\text{-}TiO_2$ 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 ۱۲٪، ۲۶٪، ۳۳٪ و ۳۸٪ شد. غلظت ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر$N\text{-}TiO_2$ تحت تأثیر نور مرئی و پس از ۴۸ ساعت سبب مهار رشد و زیستائی در سلول‌های K562 به ترتیب به میزان ۴۷٪ و ۳۸٪ گردید(نمودار۲ الف و ب). جالب اینکه نه $N\text{-}TiO_2$ در غیاب نور و نه TiO_2 دوپه نشده هیچ کدام اثرقابل توجهی بر مهار رشد و زیستائی در سلول‌های K562 نشان ندادند (نمودار ۲ ج و د).

نمودار ۱- اثرات $N\text{-}TiO_2$ بر رشد و زیستائی سلول‌های K562 تحت تابش نور مرئی. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت $N\text{-}TiO_2$ (۱۰- ۰/۰۱ میکروگرم 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 $p< 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شدند.

الف)



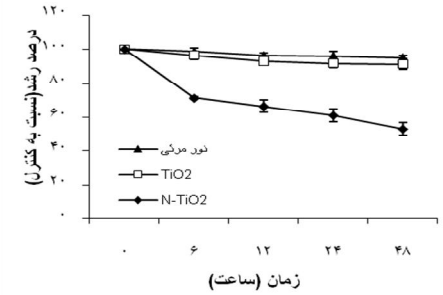
ب)



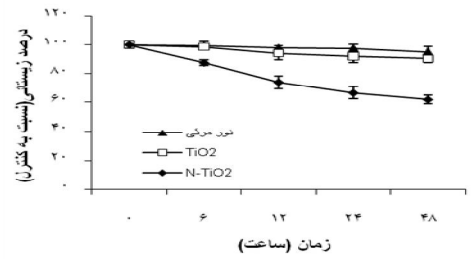
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

نمودار ۲- اثرات $N\text{-}TiO_2$ و TiO_2 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 $N\text{-}TiO_2$ (♦) و TiO_2 دوپه نشده(□) (۱۰-۰/۰۱ 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. داده‌ها به صورت ± میانگین خطای استاندارد (±SEM) نمایش داده شده و داده‌های با $p< 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شدند.

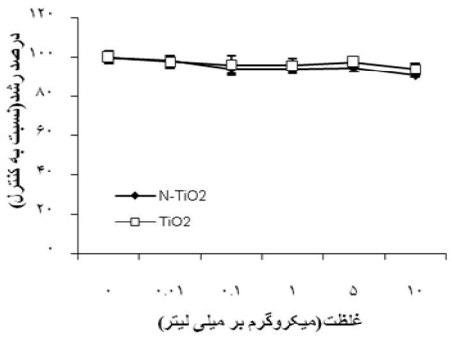
الف)



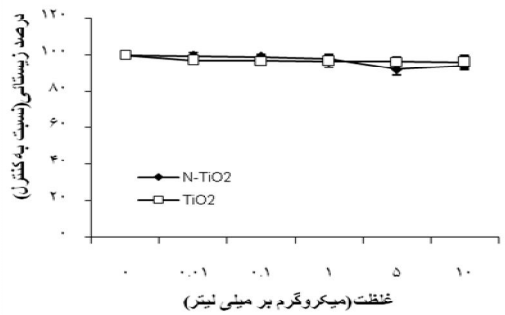
ب)



ج)



د)



$N\text{-}TiO_2$ سبب القاء آپوپتوز در سلول‌های K562 می‌گردد

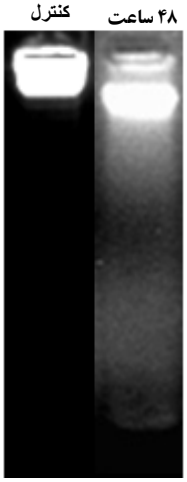
به منظور تعیین نوع مرگ سلولی القاء شده توسط $N\text{-}TiO_2$ از آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. باتوجه به شکل ۴، مشاهده‌ی لکه[13] بر روی ژل آگارز در سلول‌های تیمار شده و عدم مشاهده‌ی آن در سلول‌های کنترل، نشان-دهنده‌ی قطعه قطعه شدن DNA به عنوان یکی از شاخص‌های وقوع مرگ سلولی آپوپتوزی در سلول‌های K562 می‌باشد. لازم به ذکر است که قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های K562 در طی آپوپتوز حالت نردبانی[14] متداول را نشان نمی‌دهد.

[13] Smear

[14] Ladder

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

شکل ۴- بررسی اثرات آپوپتوزی $N\text{-}TiO_2$ بر قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های K562. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت ۱۰میکروگرم بر میلی لیتر از $N\text{-}TiO_2$، اثرات آپوپتوزی این نانوذرات در ۴۸ ساعت با استفاده از الکتروفورزDNA به کمک ژل آگارز بررسی شد.



بحث

در مطالعه‌ی حاضر نانوذرات $N\text{-}TiO_2$ به روش رسوب‌گذاری 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 TiO_2 می‌باشد، لذا نانوذرات بدست آمده در این مطالعه دارای اثرات فتوکاتالیتیکی قوی‌تر (پس از ۱۵ دقیقه تابش با نور مرئی) نسبت به مطالعه‌ی انجام شده توسط نانوذرات حاصل از روش رسوب‌گذاری با آمونیاک (پس از ۴ ساعت تابش با نور مرئی) بودند(۲۱). CML یک بیماری خونی می‌باشد که در اثر رشد کنترل نشده ی سلول‌های بنیادی/پیش‌ساز خونساز ایجاد می‌شود (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 به شمار می‌آیند (۲۹). با پیشرفت‌های 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 فتوکاتالیست $N\text{-}TiO_2$ 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 $N\text{-}TiO_2$ 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، TiO_2 دوپه نشده هیچ گونه اثری بر این سلول‌ها نشان نداد. برخی بررسی‌ها عدم تأثیر پذیری سلول‌های K562 را نسبت به TiO_2 تأئید کرده‌اند (۳۰، ۳۱). در این مطالعه نشان داده شد که زیستائی سلول‌های K562 پس از ۲۴ ساعت تیمار با $N\text{-}TiO_2$ ۱۰ µg/ml در معرض نور مرئی به حدود ۶۰ درصد کاهش یافت در حالیکه مطالعه‌ی صورت گرفته بر سلول‌های Hela نشان می‌دهد که غلظت بالاتراین نانو ذرات (۵۰ µg/ml) سبب کاهش زیستائی به همین مقدار

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

می‌شود. به علاوه مشابه نتایج بدست آمده از مطالعه‌ی ما، مطالعه‌ی صورت گرفته بر سه رده‌ی سلولی Hela، QGY کارسینومای هپاتوسلولار[15] و KB کارسینومای نازوفارنکس[16]، نشان می‌دهد که TiO_2 دوپه نشده و N-TiO_2در تاریکی اثرات قابل توجهی بر زیستائی این سلول‌ها نیز نشان نمی‌دهند (۲۱). در مقایسه با نتایج ما، چندین مطالعه اثرات ضدسرطانی TiO_2 دوپه نشده و دوپه شده با دیگر عناصر را در سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند. به عنوان مثال، اثرات مهار رشدی نانوذرات TiO_2 در سلول های L-02 و Bel-7402 هپاتوسیت انسانی به ترتیب پس از ۴۸ و ۹۶ ساعت نشان داده شده است (۳۲). در حالیکه در این مطالعه، نشان داده شد که N-TiO_2 سبب مهار رشد در سلول‌های K562 پس از مدت زمان کمتر (۴۸-۶ ساعت) می شود. به علاوه نتایج ما نشان داد که اثرات TiO_2 بر مهار زیستائی سلول‌های K562 (پس از ۲۴ ساعت) بواسطه‌ی القاء آپوپتوز صورت می‌گیرد. لازم به ذکر است که در آزمون قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های K562 تیمار شده با CBX به جای حالت نردبانی، حالت لکه مشاهده شد که می‌تواند به دلیل نقص در عملکرد آنزیم CAD[17] که نقش اصلی را در برش بین نوکلئوزومی DNA در طول آپوپتوز به عهده دارد، باشد (۳۴و ۳۳). مطالعات نشان داده‌اند که هپاتوسیت‌های انسانی L-02 تیمار شده با TiO_2 پس از گذشت مدت زمان بیشتری (۷۲ ساعت) مشخصات مرگ سلولی آپوپتوز را نشان می‌دهند (۳۲). همچنین بررسی‌های صورت گرفته توسط Lee و همکارانش حاکی از القاء آپوپتوز در سلول‌های H1299 سرطان ریه توسط غلظت بالای TiO_2 (۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) می‌باشد (۷). مشابه مطالعه‌ی ما نشان داده شده که نانوذرات TiO_2 دوپه شده با سریم (Ce(IV)) در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر سبب القاء آپوپتوز در سلول‌های Bel-7402 هپاتومای انسانی پس ازگذشت ۲۴ ساعت می‌گردد (۳۵). از آنجا که اختلال در فرآیند آپوپتوز به عنوان یک عامل مهم در فرآیند سرطانی شدن به شمار می‌آید، لذا القای آپوپتوز توسط نانوذرات N-TiO_2 می‌تواند به عنوان یک راهکار مورد توجه در درمان CML مطرح گردد. امروزه، خواص فتوکاتالیتیکی نانوذرات TiO_2 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 TiO_2 تابیده شده با نور UV طول عمر بسیارکوتاهی دارند، نانوذرات TiO_2 قادر به القای طولانی مدت اثرات ضد سرطانی نمی‌باشند (۳۶). از اینرو لزوم ارائه‌ی نانوذراتی مانند N-TiO_2 با دارا بودن خواص فتوکاتالیتیکی بیشتر و بازترکیبی کمتر که قادر به برانگیختگی الکترونی تحت تأثیر نور مرئی باشند، پیشنهاد می شود. مکانیسم اثرالقای آپوپتوزی نانوذرات N-TiO_2 در سلول‌های K562 ممکن است بواسطه‌ی گونه‌های ROS تولید شده صورت گیرد. این گونه‌ها با ایجاد استرس اکسیداتیو سبب القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌گردند. با افزایش زمان تیمار و با تولید گونه‌های ROS بیشتر، تعداد بیشتری از سلول‌ها دستخوش فرآیند آپوپتوز می‌شوند. اینکه کدام گونه‌های ROS تولید شده توسط نانوذرات N-TiO_2 سبب القای آپوپتوز می‌شوند، نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد.

[15] Hepatocellular carcinoma cells
[16] Nasopharyngeal carcinoma cells
[17] Caspase activated DNA

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

نتیجه گیری

با توجه به اثرات مهار رشدی و القای آپوپتوزی نانوذرات $N\text{-}TiO_2$ در سلول‌های K562 لوسمی انسانی، این نانوذرات می‌توانند به عنوان یک کاندیدای ویژه برای مطالعات بعدی در درمان فتوکاتالیتیکی لوسمی مورد توجه قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

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

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 TiO_2 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 TiO_2-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/TiO_2. 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 TiO_2 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 TiO_2 nanoparticles in a rectangular reactor: destruction pathway and response surface approach. Desalination 2011; 268:126–33.
11. Zaleska A. Characteristics of doped- TiO_2 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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

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 nitrogen-doped 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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]