

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

سید محمد امین موسوی<sup>۱</sup>، علیرضا ختائی<sup>۲</sup>، سروش مؤسس غفاری<sup>۳</sup>

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 دی اکسید ( $\text{TiO}_2$ ) اثرات ضد سرطانی قابل توجهی در چندین رده‌ی سلولی سرطانی نشان داده‌است. نانو  $\text{TiO}_2$  یک فتوکاتالیست مهم به شمار می‌آید که فقط در معرض نور فرابنفش (UV) فعال می‌گردد. اخیراً، تلاش‌ها بی جهت بهبود خاصیت فتوکاتالیتیکی  $\text{TiO}_2$  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  $\text{TiO}_2$  دوپه شده با نیتروژن ( $\text{N-TiO}_2$ ) در رده‌ی سلولی K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی لوسمی میلوئید مزمن (CML) و مقایسه‌ی آن با  $\text{TiO}_2$  دوپه نشده در هر دو شرایط تاریکی و در معرض نور مرئی مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** نانوذرات  $\text{N-TiO}_2$  (۸۰ نانومتر) با مخلوط کردن مکانیکی اوره با پودر  $\text{TiO}_2$  تحت شرایط ویژه‌ی آزمایشگاهی تهیه و مشخصات آن توسط میکروسکوپ الکترونی گزاره (TEM)، انکسار اشعه‌ی X (XRD) و آنالیزهای BET (Brunauer-Emmett-Teller) تأیید شد. رده‌ی سلولی K562 پس از کشت تحت تأثیر نانو ذرات  $\text{N-TiO}_2$  در غلظت‌ها و فواصل زمانی مختلف قرار گرفت. از آزمون دفع رنگ تریپان بلو به منظور بررسی رشد و زیستایی در سلول‌های K562 استفاده شد. برای بررسی نوع مرگ سلولی از الکتروفورز DNA به کمک ژل آگارز استفاده گردید.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که  $\text{N-TiO}_2$  تحت تأثیر نور مرئی سبب مهار رشد و زیستایی در سلول‌های K562 به صورت وابسته به زمان و غلظت گردید. به عنوان مثال  $\text{N-TiO}_2$  در ۴۸ ساعت و در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۵ و ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر سبب مهار رشد سلول‌های K562 به ترتیب به میزان ۳۴/۲۵٪، ۳۹/۴۴٪، ۴۷٪ و کاهش زیستایی 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  $\text{TiO}_2$  دوپه نشده هیچ گونه اثری بر رشد و زیستایی این سلول‌ها نشان نداد.

**نتیجه گیری:** با توجه به اینکه  $\text{N-TiO}_2$  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

## مقدمه

نانوذرات تیتانیوم دی اکسید ( $\text{TiO}_2$ ) یکی از مهمترین و پرکاربردترین فتوکاتالیست‌ها به شمار می‌آید. نانو  $\text{TiO}_2$  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 (۱-۳). اخیراً خواص بیولوژیکی این نانو ذرات، بویژه فعالیت ضد سرطانی آن‌ها مورد توجه محققان قرار گرفته است. به عنوان مثال اثرات ضد سرطانی نانو ذرات  $\text{TiO}_2$  در انواع متفاوتی از سلول‌های سرطانی از قبیل سلول‌های بنیادی مزانشیما (۴)، لمفوبلاستوئید (۵)، سلول‌های سرطان سینه (۶) و ریه (۷) مشاهده شده است. الکترون‌های موجود در لایه‌ی ظرفیت فتوکاتالیست‌های  $\text{TiO}_2$  در حضور نور فرابنفش<sup>۱</sup> (UV) با طول موج کمتر از ۴۰۰ نانومتر، برانگیخته می‌شوند. در نتیجه‌ی این برانگیختگی جفت الکترون-حفره پدید می‌آید که قادر به القاء استرس اکسیداتیو از طریق تولید گونه‌های اکسیژن فعال<sup>۲</sup> (ROS) از قبیل آنیون سوپراکسید ( $\text{O}_2^-$ )، هیدروژن پراکسید ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) و رادیکال هیدروکسیل (OH) می‌باشد (۸). اما به هر حال، یکی از مشکلات مهم این نانوذرات سطح بالای انرژی شکاف باند<sup>۳</sup> (۳/۲ الکترون ولت برای ایزوتوپ آاناتاز  $\text{TiO}_2$ ) و در نتیجه برانگیختگی توسط نور UV و امکان بازترکیبی الکترون-حفره می‌باشد (۹، ۱۰). از اینرو، تلاش‌های بسیاری جهت بهبود فعالیت فتوکاتالیتیکی  $\text{TiO}_2$  و کاهش خواص

بازترکیبی این نانوذرات با ایجاد سطوح جدید الکترونی در جریان است. تاکنون چندین فتوکاتالیست  $\text{TiO}_2$  دوپه شده با فلزات و نافلزات<sup>۴</sup> سنتز شده‌اند که با ایجاد نقص در شبکه‌ی  $\text{TiO}_2$  قادر به کاهش انرژی شکاف باند در این نانوذرات شده‌اند (۱۱). دوپه کردن فلزات با  $\text{TiO}_2$  اغلب به دلیل طول عمر کوتاه ناقل‌های ایجاد شده باعث کاهش خصلت فتوکاتالیتیکی می‌شود (۱۱). مطالعات صورت گرفته نشان داده‌اند که دوپه کردن نافلزاتی از قبیل نیتروژن (N)، کربن (C)، گوگرد (S) و فلورور (F) با  $\text{TiO}_2$  سبب کاهش خصلت بازترکیبی و بهبود فعالیت فتوکاتالیتیکی این نانوذره تحت نور مرئی، با طول موج بیشتر از ۴۰۰ نانومتر می‌شوند (۱۵-۱۲). از میان این نافلزات، نیتروژن به دلیل دارا بودن انرژی یونیزاسیون کم، اندازه‌ای مشابه اندازه‌ی اکسیژن و پایداری بالا حائز اهمیت می‌باشد.  $\text{TiO}_2$  دوپه شده با نیتروژن ( $\text{N-TiO}_2$ ) 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  $\text{TiO}_2$  شده و یک سطح انرژی جدید در شکاف باند  $\text{TiO}_2$  پدید می‌آورد که سبب کاهش خصلت باز ترکیبی الکترون-حفره می‌شود (۱۶). تاکنون روش‌های متفاوتی برای تهیه‌ی نانوذرات N- $\text{TiO}_2$  به کار گرفته شده است که شامل روش‌های فیزیکی و شیمیایی می‌باشند. روش‌های شیمیایی ساده‌تر و ارزانتر بوده و شامل رسوبگذاری نانوذرات  $\text{TiO}_2$  تحت منابع نیتروژن از قبیل آمونیاک و اوره می‌باشد. از آنجا که آمونیاک ترکیبی فرار بوده و بخشی از آن طی فرآیند رسوب گذاری 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

<sup>۱</sup> Ultraviolet light<sup>۲</sup> Reactive oxygen species<sup>۳</sup> Band gap energy

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره هجدهم / بهار ۱۳۹۲

<sup>۴</sup> Metal and non-metal doped  $\text{TiO}_2$  photocatalyst

جهت مشاهده‌ی نمونه‌ی مورد نظر با TEM ابتدا پودر N-TiO<sub>2</sub> 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-TiO<sub>2</sub>، اندازه گیری های XRD (Siemens X-ray diffraction D5000, Cu K $\alpha$  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-TiO<sub>2</sub> و TiO<sub>2</sub>

ابتدا استوک ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در محیط کشت RPMI 1640 تهیه شد. سپس جهت حذف تجمعات<sup>۷</sup> 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<sup>۸</sup> افزوده شد و پس از تهیه‌ی رقت‌های مورد نظر جهت تیمار سلولی مورد استفاده قرار گرفت. TiO<sub>2</sub> 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  $\mu\text{g/ml}$ ) و پنی سیلین (۱۰۰ U/ml) (سینازن-ایران) در انکوباتور با شرایط CO<sub>2</sub>

اکسیژن میان‌کنش داده و دسترسی به جایگاه‌های Ti<sup>4+</sup> را محدود کنند و سبب کاهش سطح ویژه‌ی نانوذرات شوند. بنابراین در این مطالعه نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> به روش رسوب‌گذاری با اوره تهیه شد تا از اثرات کاهش سطح ویژه‌ی ذرات جلوگیری شود (۱۷، ۱۸). تا کنون اثرات نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> 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-TiO<sub>2</sub> و TiO<sub>2</sub> 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.

#### تهیه‌ی نانوذرات N-TiO<sub>2</sub>

نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> توسط مخلوط کردن مکانیکی اوره (Merck-آلمان) با پودر TiO<sub>2</sub> (Coteix KA-100 (anatase: >99%) - 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<sup>2</sup>/g بود. این مشخصات توسط میکروسکوپ الکترونی گزاره<sup>۵</sup> (TEM)، انکسار اشعه‌ی X<sup>۶</sup> (XRD) و آنالیزهای BET (Brunauer-Emmett-Teller) تأیید شد.

<sup>7</sup> Aggregate

<sup>8</sup> Dispersion stabilizer

<sup>5</sup> Transmission electron microscopy

<sup>6</sup> X-ray diffraction

از سانتیفرژ، سلول‌ها با ۲۰ میکرولیتر بافر لیز کننده شامل EDTA<sup>۱۰</sup> ۱۰۰ میلی مولار، SDS<sup>۱۱</sup> ۰/۸ درصد وزنی- حجمی، Tris-HCl ۲۰ میلی مولار، pH=۸ (Merck)-آلمان) لیز و سپس ۱۰ میکرولیتر RNase A/T1 و پروتیناز K (Fermentas-آلمان) هر کدام بطور جداگانه افزوده شد و در ۵۰ درجه 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 نمونه‌های 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

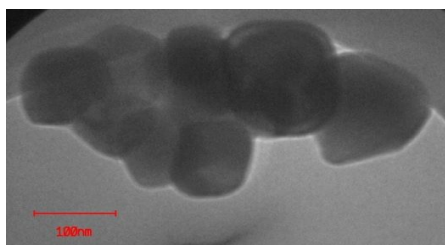
تمامی داده‌های بدست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بوده و داده‌ها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2003 و آزمون آماری Student-t-test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و داده‌های با ارزش  $P < 0/05$  از نظر آماری معنی دار تلقی شدند.

### یافته‌ها

#### میکروسکوپ TEM

تصویر بدست آمده از میکروسکوپ TEM در شکل ۱ آمده است. بر اساس فرمول Debye-Scherrer اندازه‌ی متوسط کریستال‌های نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> ۸۰ نانومتر محاسبه شد.

شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی (TEM) N-TiO<sub>2</sub>



<sup>10</sup> Ethylenediamine tetraacetic acid

<sup>11</sup> Sodium dodecyl sulfate

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-TiO<sub>2</sub> بر تغییرات ریخت شناسی سلول‌های K562، تعداد ۱۰<sup>۵</sup> سلول در پلیت ۲۴ چاهکی (SPL life science - کره جنوبی) قرار داده شد. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف N-TiO<sub>2</sub> (۰/۱، 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 سلول‌های 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 ۴×۱۰<sup>۴</sup> سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ چاهکی با غلظت‌های ۰/۱ تا ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر از N-TiO<sub>2</sub> و TiO<sub>2</sub> 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، ۲۴ و ۴۸ ساعت، تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده از هموسایتومتر و رنگ تریپان بلو (Sigma-آمریکا) مورد سنجش قرار گرفت (۲۳).

### بررسی قطعه قطعه شدن DNA<sup>۹</sup>

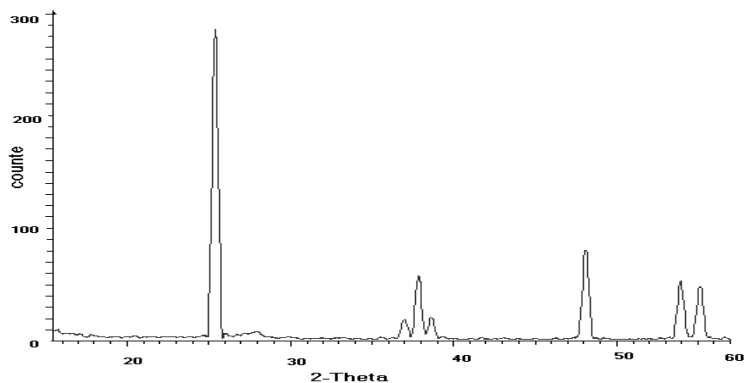
برای بررسی قطعه قطعه شدن DNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید، بدین منظور تعداد ۵×۱۰<sup>۵</sup> سلول با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر N-TiO<sub>2</sub> تیمار شد. پس

<sup>9</sup> DNA fragmentation

### طیف XRD

مطابق شکل ۲ پیک‌های XRD بدست آمده یک پیک بزرگ در  $2\theta = 25.3^\circ$  و پیک‌های کوچک در  $48.1^\circ$ ،  $53.9^\circ$  و  $55.1^\circ$  را نشان می‌دهد که حاکی از آنازاد بودن نانوذرات است. اثرات فتوکاتالیتیکی آنازاد بیش از سایر فرم‌های کریستالی بوده لذا این فرم برای بررسی اثرات فتوسیتوتوکسیسیته<sup>۱۲</sup> این نانوذرات مناسبتر است.

شکل ۲- پیک های حاصل از انکسار اشعه ی X (XRD) مربوط به N-TiO<sub>2</sub>.



### N-TiO<sub>2</sub> سبب ایجاد تغییرات ریخت‌شناسی در سلول‌های K562 می‌گردد

مشاهدات میکروسکوپ نوری نشان دهنده وقوع تغییرات ظاهری چشمگیری در سلول‌های تیمار شده با N-TiO<sub>2</sub> تاییده شده با نور مرئی می‌باشد (شکل ۳). در ۶ و ۱۲ ساعت پس از تیمار با N-TiO<sub>2</sub> چسبندگی سلولی مشاهده شد. با گذشت زمان (۲۴ و ۴۸ ساعت) غشای سلول‌های K562 تیمار شده با N-TiO<sub>2</sub> چروکیده شده و اجسام کوچکی شبیه اجسام آپوپتوتیک شکل گرفتند.

شکل ۳- تغییرات ظاهری سلول‌های K562 تیمار شده با N-TiO<sub>2</sub>. پس از تیمار سلول‌ها با ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر N-TiO<sub>2</sub> به مدت ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت خصوصیات ظاهری آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری با درشت نمایی ۴۰X مورد بررسی قرار گرفت. چسبندگی سلولی با پیکان سفید و چروکیدگی غشاء و تشکیل اجسام آپوپتوتیک با پیکان سیاه نمایش داده شده اند

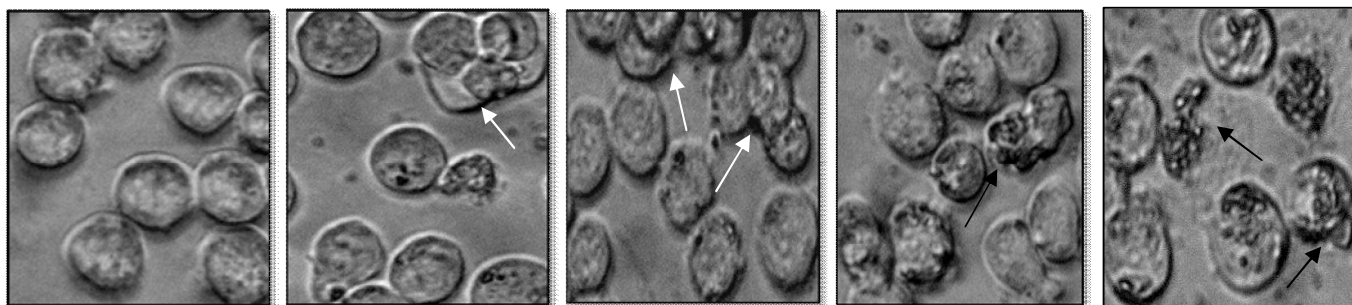
کنترل

۶ ساعت

۱۲ ساعت

۲۴ ساعت

۴۸ ساعت



<sup>12</sup> Photocytotoxicity

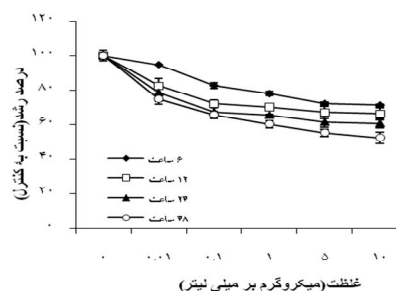
### N-TiO<sub>2</sub> سبب مهار رشد و زیستایی در سلول‌های K562 می‌گردد

اثر غلظت‌های متفاوت N-TiO<sub>2</sub> در رشد و زیستایی سلول‌های K562 در فواصل زمانی مختلف، در حضور و در غیاب نور مرئی بررسی شد. همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود N-TiO<sub>2</sub> تاییده شده با نور مرئی سبب مهار رشد و زیستایی در سلول‌های K562 به صورت وابسته به غلظت می‌گردد. به عنوان مثال N-TiO<sub>2</sub> در ۴۸ ساعت و در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سبب مهار رشد سلول‌های K562 به ترتیب به میزان ۰/۲۵، ۰/۳۴، ۰/۳۹، ۰/۴۴ و ۰/۴۷ (نمودار ۱- الف) و کاهش زیستایی به ترتیب ۰/۱۱، ۰/۲۲، ۰/۳۰، ۰/۳۵ و ۰/۳۸ (گردید (نمودار ۱- ب). به علاوه، همانطور که در نمودار ۲ (الف و ب) مشاهده می‌شود اثرات مهاری N-TiO<sub>2</sub> بر

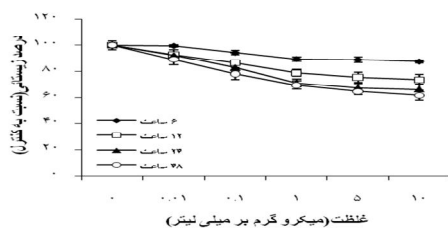
رشد و زیستایی این سلول‌ها به صورت وابسته به زمان نیز مشاهده شد بطوریکه غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر N-TiO<sub>2</sub> تحت تأثیر نور مرئی و در فواصل زمانی ۶، ۱۲، ۲۴، و ۴۸ ساعت سبب مهار رشد سلول‌های K562 به ترتیب به میزان ۰/۲۸، ۰/۳۳، ۰/۳۸ و ۰/۴۷ و مهار زیستایی به ترتیب به میزان ۰/۱۲، ۰/۲۶، ۰/۳۳ و ۰/۳۸ شد. غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر N-TiO<sub>2</sub> تحت تأثیر نور مرئی و پس از ۴۸ ساعت سبب مهار رشد و زیستایی در سلول‌های K562 به ترتیب به میزان ۰/۴۷ و ۰/۳۸ (گردید (نمودار ۲ الف و ب). جالب اینکه نه N-TiO<sub>2</sub> در غیاب نور و نه TiO<sub>2</sub> دوپه نشده هیچ کدام اثر قابل توجهی بر مهار رشد و زیستایی در سلول‌های K562 نشان ندادند (نمودار ۲ ج و د).

نمودار ۱- اثرات N-TiO<sub>2</sub> بر رشد و زیستایی سلول‌های K562 تحت تابش نور مرئی. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت N-TiO<sub>2</sub> (۰/۰۱-۱۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در فواصل زمانی ۶ ساعت (◆)، ۱۲ ساعت (□)، ۲۴ ساعت (▲) و ۴۸ ساعت (○) درصد مهار رشد (الف) و زیستایی سلول‌ها (ب) با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو مطابق مواد و روش‌ها 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)

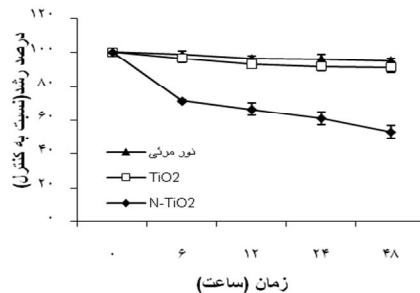
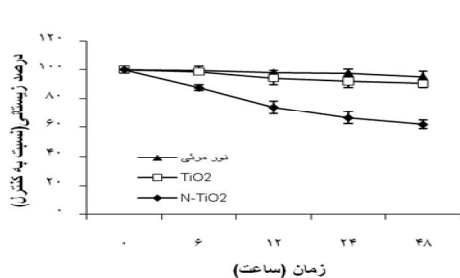


(ب)

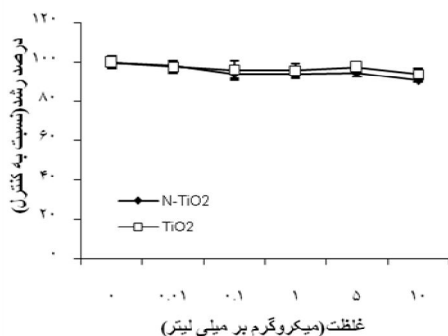
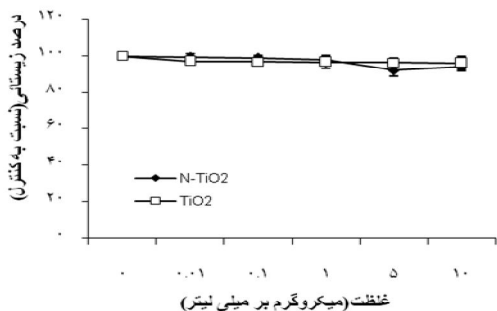


نمودار ۲- اثرات  $\text{TiO}_2$  و  $\text{N-TiO}_2$  دوپه نشده بر رشد (الف و ج) و زیستایی (ب و د) سلول های K562 تحت تابش نور مرئی (الف و ب) و بدون تابش (ج و د). پس از تیمار سلول ها با  $\text{N-TiO}_2$  (♦) و  $\text{TiO}_2$  دوپه نشده (□) (۱۰-۰/۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۴۸ ساعت درصد مهار رشد (الف) و زیستایی سلول ها (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  $\pm$  میانگین خطای استاندارد ( $\pm$ SEM) نمایش داده شده و داده های با  $p < 0.05$  از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شدند.

(الف) (ب)



(د) (ج)



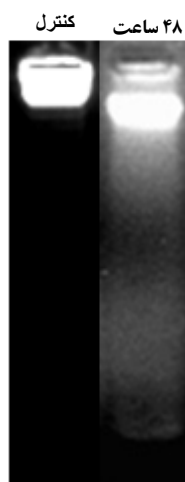
شاخص های وقوع مرگ سلولی آپوپتوزی در سلول های K562 می باشد. لازم به ذکر است که قطعه قطعه شدن DNA در سلول های K562 در طی آپوپتوز حالت نردبانی<sup>۴</sup> متداول را نشان نمی دهد.

**N-TiO<sub>2</sub> سبب القاء آپوپتوز در سلول های K562 می گردد**  
 به منظور تعیین نوع مرگ سلولی القاء شده توسط N-TiO<sub>2</sub> از آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. با توجه به شکل ۴، مشاهده ی لکه <sup>۱۳</sup> بر روی ژل آگارز در سلول های تیمار شده و عدم مشاهده ی آن در سلول های کنترل، نشان دهنده ی قطعه قطعه شدن DNA به عنوان یکی از

<sup>14</sup> Ladder

<sup>13</sup> Smear

شکل ۴- بررسی اثرات آپوپتوزی N-TiO<sub>2</sub> بر قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های K562. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر از N-TiO<sub>2</sub>، اثرات آپوپتوزی این نانوذرات در ۴۸ ساعت با استفاده از الکتروفورز DNA به کمک ژل آگارز بررسی شد.



### بحث

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-TiO<sub>2</sub> 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-TiO<sub>2</sub> تابیده شده با نور مرئی سبب مهار رشد و زیستایی به صورت وابسته به غلظت و زمان در سلول-های K562 گردیدند. جالب توجه اینکه، TiO<sub>2</sub> دوپه نشده هیچ گونه اثری بر این سلول‌ها نشان نداد. برخی بررسی‌ها عدم تأثیر پذیری سلول‌های K562 را نسبت به TiO<sub>2</sub> تأیید کرده‌اند (۳۰، ۳۱). در این مطالعه نشان داده شد که زیستایی سلول‌های K562 پس از ۲۴ ساعت تیمار با N-TiO<sub>2</sub> 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 بالاتر این نانو ذرات (۵۰ µg/ml) سبب کاهش زیستایی به همین مقدار

در مطالعه‌ی حاضر نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> می‌باشد، لذا نانوذرات بدست آمده در این مطالعه دارای اثرات فتوکاتالیستی 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 نشده‌ی 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 می‌کنند اما اثرات جانبی و مقاومت سلول‌های توموری از مشکلات عمده‌ی این راهکار درمانی

۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر سبب القاء آپوتوز در سلول‌های Bel-7402 هپاتوما‌ی انسانی پس از گذشت ۲۴ ساعت می‌گردد (۳۵). از آنجا که اختلال در فرآیند آپوتوز به عنوان یک عامل مهم در فرآیند سرطانی شدن به شمار می‌آید، لذا القای آپوتوز توسط نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> می‌تواند به عنوان یک راهکار مورد توجه در درمان CML مطرح گردد. امروزه، خواص فتوکاتالیتیکی نانوذرات TiO<sub>2</sub> تحت تأثیر نور UV به خوبی شناخته شده است. اما چون نور UV برای بدن مضر بوده و از سوی دیگر گونه‌های ROS تولید شده توسط TiO<sub>2</sub> تاییده شده با نور UV طول عمر بسیار کوتاهی دارند، نانوذرات TiO<sub>2</sub> قادر به القای طولانی مدت اثرات ضد سرطانی نمی‌باشند (۳۶). از اینرو لزوم ارائه‌ی نانوذراتی مانند N-TiO<sub>2</sub> با دارا بودن خواص فتوکاتالیتیکی بیشتر و بازترکیبی کمتر که قادر به برانگیختگی الکترونی تحت تأثیر نور مرئی باشند، پیشنهاد می‌شود. مکانیسم اثر القای آپوتوزی نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در سلول‌های K562 ممکن است بواسطه‌ی گونه‌های ROS تولید شده صورت گیرد. این گونه‌ها با ایجاد استرس اکسیداتیو سبب القای آپوتوز در این سلول‌ها می‌گردند. با افزایش زمان تیمار و با تولید گونه‌های ROS بیشتر، تعداد بیشتری از سلول‌ها دستخوش فرآیند آپوتوز می‌شوند. اینکه کدام گونه‌های ROS تولید شده توسط نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> سبب القای آپوتوز می‌شوند، نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد.

می‌شود. به علاوه مشابه نتایج بدست آمده از مطالعه‌ی ما، مطالعه‌ی صورت گرفته بر سه رده‌ی سلولی QGY, Hela، کارسینوما‌ی هپاتوسلولار<sup>۱۵</sup> و KB کارسینوما‌ی نازوفارنکس<sup>۱۶</sup>، نشان می‌دهد که TiO<sub>2</sub> دوپه نشده و N-TiO<sub>2</sub> در تاریکی اثرات قابل توجهی بر زیستایی این سلول‌ها نیز نشان نمی‌دهند (۲۱). در مقایسه با نتایج ما، چندین مطالعه اثرات ضدسرطانی TiO<sub>2</sub> دوپه نشده و دوپه شده با دیگر عناصر را در سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند. به عنوان مثال، اثرات مهار رشدی نانوذرات TiO<sub>2</sub> در سلول‌های 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<sub>2</sub> سبب مهار رشد در سلول‌های K562 پس از مدت زمان کمتر (۴۸-۶ ساعت) می‌شود. به علاوه نتایج ما نشان داد که اثرات TiO<sub>2</sub> بر مهار زیستایی سلول‌های K562 (پس از ۲۴ ساعت) بواسطه‌ی القاء آپوتوز 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<sup>۱۷</sup> که نقش اصلی را در برش بین نوکلئوزومی DNA در طول آپوتوز به عهده دارد، باشد (۳۳ و ۳۴). مطالعات نشان داده‌اند که هپاتوسیت‌های انسانی L-02 تیمار شده با TiO<sub>2</sub> پس از گذشت مدت زمان بیشتری (۷۲ ساعت) مشخصات مرگ سلولی آپوتوز را نشان می‌دهند (۳۲). همچنین بررسی‌های صورت گرفته توسط Lee و همکارانش حاکی از القاء آپوتوز در سلول‌های H1299 سرطان ریه توسط غلظت بالای TiO<sub>2</sub> (۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) می‌باشد (۷). مشابه مطالعه‌ی ما نشان داده شده که نانوذرات TiO<sub>2</sub> دوپه شده با سریم (Ce(IV)) در غلظت

<sup>15</sup> Hepatocellular carcinoma cells

<sup>16</sup> Nasopharyngeal carcinoma cells

<sup>17</sup> Caspase activated DNA

## نتیجه گیری

با توجه به اثرات مهار رشدی و القای آپوپتوزی نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> 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 از معاونت 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 Chimie* 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>-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<sub>2</sub>. *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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> nanoparticles in a rectangular reactor: destruction pathway and response surface approach. *Desalination* 2011; 268:126–33.
11. Zaleska A. Characteristics of doped- TiO<sub>2</sub> 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. Umabayashi 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<sub>2</sub> 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 TiO<sub>2</sub> nanoparticle catalyst and its catalytic activity under visible light. *Chin J Chem 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<sub>2</sub> (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<sub>2</sub> 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 TiO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> in melanoma tumors. *J Control Release* 2011; 149:190-5.