

اثر نانو ذرات تیتانیوم دی اکسید ناخالص شده با نیتروژن بر رده‌ی سلول سرطانی A-375 ملانومای انسانی

مریم شریفی،^۱ دکتر سید محمد امین موسوی^۲، دکتر طاهره ناجی^۳

نویسنده‌ی مسوول: گروه زیست فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران a-moosavi@nigeb.ac.ir

دریافت: ۹۴/۱۰/۱۹ پذیرش: ۹۵/۳/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: تیتانیوم دی اکسید (TiO_2) یکی از حساسگرهای نوری قوی در فوتودینامیک تراپی (PDT) است که تحت اشعه‌ی فرابنفش (UV) فعال می‌گردد. هدف از این مطالعه بررسی اثر نانو ذرات تیتانیوم دی اکسید ناخالص شده با نیتروژن بر رده‌ی سلولی A-375 ملانومای انسانی بود.

روش بررسی: نانو ذرات N-TiO_2 توسط مخلوط کردن مکانیکی اوره با پودر TiO_2 به نسبت ۴ به ۱ تهیه شدند. سلول‌های A-375 با غلظت‌های مختلف از N-TiO_2 در فواصل زمانی مختلف در حضور و غیاب نور مرئی تیمار شدند. رشد و زیستایی سلول‌های A-375 به ترتیب به وسیله‌ی آزمون دفع رنگ تریپان بلو و MTT بررسی شدند. رنگ آمیزی آکریدین اورنج/تیدیوم بروماید و الکتروفورز ژل DNA برای بررسی آپپتوز به کار برده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد N-TiO_2 فعال شده با نور مرئی می‌تواند سبب مهار رشد به صورت وابسته به غلظت (۱۰۰ - ۱۰٪ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و زمان شود. کاهش زیستایی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد که نتایج حاصله از میکروسکوپ فلورسنت و قطعه‌ی قطع شده DNA وقوع مرگ سلولی آپپتوتیک را در این غلظت نشان می‌دهد.

نتیجه گیری: با دستیابی به اثرات ضد سرطانی N-TiO_2 بر سلول‌های A-375 می‌توان این نانو ذرات را برای ارزیابی بیشتر به عنوان یک حساسگر نوری جدید در درمان فوتوکاتالیتیکی سرطان پوست پیشنهاد داد.

واژگان کلیدی: تیتانیوم دی اکسید، ناخالص سازی با نیتروژن، فوتودینامیک تراپی، ملانوما

۱- کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، گروه آموزشی سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران

۲- دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار گروه زیست فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

۳- دکترای تخصصی بیولوژی آبیان، استادیار گروه آموزشی سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران

مقدمه

سرطان‌ها علت ۹ درصد از کل مرگ‌ها و دومین علت عمده‌ی مرگ و میر در جهان هستند که در این بین سرطان پوست یکی از شایع‌ترین انواع سرطان‌ها در اکثر کشورها می‌باشد که به دو گروه ملانومایی و غیر ملانومایی تقسیم می‌شود (۱). ملانوما تومور بدخیم پوست با منشأ ملانوسیت‌ها است که نوع ملانومایی سرطان پوست است. ملانوما ۲ درصد از کل سرطان‌ها را شامل می‌شود که کشنده‌ترین نوع سرطان پوست است و طی ۲۰ سال اخیر بروز آن دو برابر شده است (۲ و ۳). روش‌های درمانی ملانوما شامل جراحی، شیمی درمانی، پرتودرمانی، هورمون درمانی و فوتودینامیک تراپی (PDT) می‌باشد (۶-۴). PDT یک روش غیر تهاجمی است که موجب کم‌ترین آسیب به بافت‌های نرمال اطراف ضایعه می‌شود (۷). PDT فعال سازی یک ماده‌ی حساس‌گر نوری از طریق نور است که منجر به تولید عوامل سمی کشنده‌ای مثل ROS (Reactive Oxygen Species) می‌شود که در نهایت موجب القای مرگ سلولی می‌شود (۸).

نانو ذرات TiO_2 نیمه رسانا هستند به‌عنوان یک کاتالیزور نوری منحصر به فرد شناخته شده است، دلیل آن سمیت کم، پایداری بالا، سازگاری زیستی فوق العاده، واکنش‌پذیری نوری، ارزان بودن و در دسترس بودن این نانوذره است که به سه شکل کریستالی آناتاز، روتیل و بروکیت یافت می‌شوند. در این بین آناتاز بیشترین سهم فعالیت فوتوکاتالیتیکی را دارد (۹ و ۱۰). اثر خود تمیز شونده‌ی، نقش ضد بخار، خاصیت ضد میکروبی، تصفیه‌ی هوا و آب، استفاده در سلول‌های خورشیدی و همچنین کاربرد در زمینه‌های پزشکی از کاربردهای نانوذرات TiO_2 می‌باشد (۱۱). از جمله کاربردهای پزشکی که امروزه توجه ویژه‌ای به آن شده است می‌توان به PDT برای درمان سرطان، دارورسانی، عکس برداری و تشخیص زود هنگام اشاره کرد (۱۲). فعالیت ضد سرطانی و کشندگی TiO_2 برای اولین بار توسط فوجی شیمای

و همکاران بر روی سلول‌های Hela گزارش شد (۱۳). در ادامه محققان زیادی تاثیرات سمی و کشنده‌ی TiO_2 را بر روی سلول‌های سرطانی در حضور اشعه‌ی UV به اثبات رساندند. به‌طور مثال خواص ضد سرطانی نانوذرات TiO_2 در سلول‌های سرطانی MCF-7 و MDA-MB-468 (کارسینومای سینه)، Hela (کارسینومای دهانه‌ی رحم)، WIL2-NS (لنفوبلاستوئید)، H1299 (کارسینومای ریه)، T24 (کارسینومای مثانه)، Ls-174-t (کارسینومای کولون) اثبات شده است (۱۹-۱۴). تحت تابش UV با طول موج کمتر از ۳۸۷ نانومتر، الکترون‌های موجود در لایه‌ی ظرفیت TiO_2 برانگیخته شده و به لایه‌ی هدایت می‌روند و در نتیجه جفت الکترون - حفره پدید می‌آید، که قادر به القای استرس اکسیداتیو از طریق تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن مثل آنیون سوپر اکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل ($\text{OH}^\bullet$)، اکسیژن منفرد ($^1\text{O}_2$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شود که با مولکول‌های بیولوژیک واکنش می‌دهند و موجب آسیب به آنها و در نهایت موجب القای مرگ سلولی می‌شوند (۲۰). با این وجود یکی از مهم‌ترین محدودیت‌ها در استفاده از نانوذرات TiO_2 بالا بودن سطح انرژی شکاف-باند ($3/2$ الکترون ولت برای ایزوتوپ آناتاز TiO_2) است که موجب می‌شود این نانوذره تحت تاثیر نور UV برانگیخته شود (۲۱). اشعه‌ی UV، اشعه‌ای زیان بخش است که مانع کاربردهای عملی و سودمند در درمان سرطان می‌شود. همچنین در مورد نانوذرات TiO_2 نیز امکان بازترکیبی الکترون - حفره نیز وجود دارد (۲۲). به دلایل فوق لازم است این فتوکاتالیست به نحوی اصلاح شود. از این رو تلاش‌های بسیاری جهت بهبود فعالیت فتوکاتالیتیکی TiO_2 و کاهش خواص بازترکیبی صورت گرفته است. ناخالص سازی با فلزاتی از قبیل آهن (Fe)، کبالت (Co)، نیکل (Ni) و نافلزاتی از قبیل نیتروژن (N)، کربن (C)، گوگرد (S) سبب بهبود فعالیت فتوکاتالیتیکی این نانوذره، تحت نور مرئی با

شد و پس از تهیه‌ی رقت‌های مورد نظر جهت تیمار سلولی مورد استفاده قرار گرفت.

کشت سلول: رده‌ی سلولی A-375 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. برای رشد سلول‌ها از محیط کشت DMEM که غنی شده با سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک‌های استروپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) (Biosera-انگلیس) بود، استفاده گردید. سلول‌ها در مدت کشت سلولی در انکوباتور با شرایط CO_2 ۵ درصد، رطوبت ۹۵ درصد و دمای $37^\circ C$ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند و نیز هر ۴۸ ساعت یک بار مورد پاساژ و تعویض مجدد محیط کشت قرار گرفتند.

بررسی ریخت شناسی سلولی: به‌منظور بررسی اثرات نانوذرات $N-TiO_2$ بر تغییرات ریخت شناسی سلول‌های A-375 تعداد 1.5×10^3 سلول در پلیت ۹۶ چاهکی قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها با غلظت‌های ۰/۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار شدند و به مدت ۲۰ دقیقه در معرض لامپ زنون ۵۰ وات قرار گرفتند، سپس انرژی نوری معادل ۲۴ ژول بر سانتی‌متر مربع که توسط دستگاه ترموپیل سنجیده شده است به نمونه‌ها وارد شد. جهت حذف امواج UV از فیلتر ۴۰۰ نانومتر استفاده شد. پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت، تغییرات ریخت شناسی سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده (کنترل) با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی رشد و زیستایی سلولی: برای بررسی رشد و زیستایی سلولی از آزمون دفع رنگ تریپان بلو استفاده شد. بدین منظور تعداد 1.5×10^3 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ چاهکی با غلظت‌های ۰/۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از $N-TiO_2$ تیمار شد. سپس در معرض نور مرئی در حضور فیلتر ۴۰۰ نانومتر به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. پس از

طول موج بیشتر از ۴۰۰ نانومتر می‌شود (۲۳). دلیل انتخاب نیتروژن از میان نافلزات، پایداری بالا، انرژی یونیزاسیون کم و شبیه بودن اندازه‌ی آن به اکسیژن است (۲۴). تاکنون اثرات ضد سرطانی نانوذرات $N-TiO_2$ در سلول‌های سرطانی K562 (لوسمی انسان)، Hela (کارسینومای دهانه رحم)، QGY (کارسینومای کبد) و KB (کارسینومای نازوفارنگس) بررسی شده است (۲۵ و ۲۶). این مطالعه به‌منظور بررسی اثرات ضد سرطانی $N-TiO_2$ در رده‌ی سلولی A-375 ملانومای انسانی صورت پذیرفت.

روش بررسی

تهیه‌ی نانوذرات $N-TiO_2$: نانوذرات $N-TiO_2$ توسط مخلوط کردن مکانیکی اوره (Merck-آلمان) با پودر Coteix-KA- TiO_2 (۹۹ درصد) $>anatase$ ۱۰۰ (Coteix-کره جنوبی) به نسبت ۴ به ۱ در دانشگاه تبریز تهیه شد. ابتدا این مواد تحت اتمسفر هوا در دمای $400^\circ C$ درجه‌ی سانتی‌گراد با نرخ گرمایش $10^\circ C$ درجه‌ی سانتی‌گراد در دقیقه قرار گرفت، سپس تا رسیدن به دمای اتاق سرد شد. پس از خرد کردن در آون، پودر زرد رنگ سبک وزنی به‌دست آمد که اندازه‌ی کریستال‌های آن ۸۰ نانومتر و مساحت سطح ویژه‌اش ۹/۸۲ مترمربع بر گرم بود. این مشخصات توسط میکروسکوپ الکترونی گزاره (TEM) و انکسار اشعه‌ی X (XRD) و آنالیزهای BET تایید شد (۲۶ و ۲۵).

تهیه‌ی استوک $N-TiO_2$: ابتدا استوک ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات $N-TiO_2$ در محیط کشت DMEM تهیه شد. سپس جهت حذف تجمعات نانوذرات، سوسپانسیون حاصل به مدت ۲۰ دقیقه تحت نوسان اولتراسونیک با قدرت ۵۰ درصد قرار گرفت. نهایتاً FBS ۱۰ درصد حجمی - حجمی به‌عنوان عامل پایدار کننده‌ی سوسپانسیون، "عامل پایدارکننده و مهارکننده تجمعات (Aggregation)" افزوده

لامل پوشانده شد و سپس با میکروسکوپ فلورسنت تصویر برداری گردید.

مطالعه‌ی آپتوز با آزمون قطعه قطعه شدن DNA: برای بررسی قطعه قطعه شدن DNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید. بدین منظور تعداد 35×10^4 سلول را در پلیت ۲۴ چاهکی قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از N-TiO₂ تیمار شدند. سپس تحت تاثیر نور مرئی قرار گرفتند. پس از سانتریفوژ، سلول‌ها با ۲۰ میکرولیتر بافر لیز کننده شامل (EDTA ۱۰۰ میلی‌مولار، SDS ۰/۸ درصد وزنی - حجمی، Tris-Hcl ۲۰ میلی‌مولار، PH = ۸) لیز شدند. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه گردید و به مدت یک شب در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از افزودن ۵ میکرولیتر بافر لودینگ ۶x (گلیسرول ۳۰ درصد و بروموفنول بلو ۲۵ درصد) 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: در مطالعه‌ی پژوهشی حاضر که تجربی - آزمایشگاهی می‌باشد، تمامی داده‌های به‌دست آمده حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بوده و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel و آزمون آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و داده‌های با ارزش $P < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار تلقی شدند.

یافته‌ها

N-TiO₂ فعال شده توسط نور، سبب ایجاد تغییرات ریخت شناسی در سلول‌های A-375 می‌گردد. بررسی تغییرات ریخت شناسی سلول‌های A-375 تیمار شده با N-TiO₂ با استفاده از میکروسکوپ نوری نشان دهنده‌ی تغییرات در ظاهر سلول‌های تیمار شده با N-TiO₂ می‌باشد.

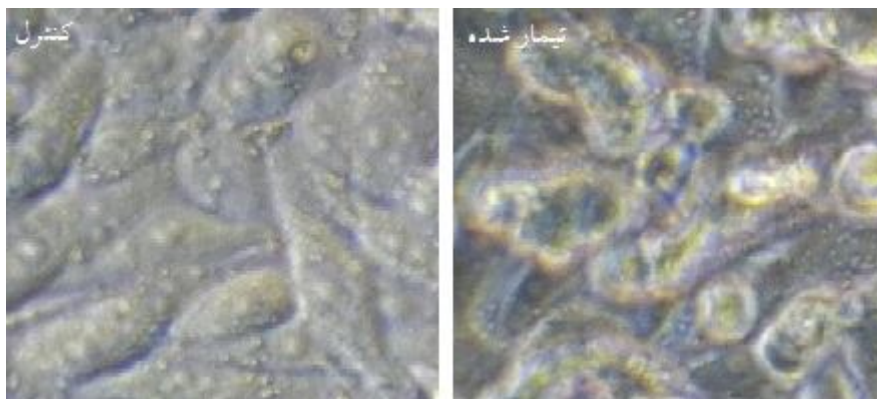
گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت، تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده از هموسایتومتر و رنگ تریپان بلو مورد سنجش قرار گرفت.

آزمون ارزیابی سمیت N-TiO₂: به منظور بررسی اثرات سمی N-TiO₂ بر سلول‌های A-375 و تایید نتایج به‌دست آمده از شمارش سلولی از آزمون MTT استفاده شد. به‌طور کلی از آزمون MTT برای اندازه گیری سمیت و تکثیر سلولی استفاده می‌شود. بدین منظور تعداد 15×10^3 سلول در پلیت ۹۶ چاهکی قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها با غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر N-TiO₂ تیمار شدند و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در معرض نور مرئی قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت ابتدا پلیت حاوی نمونه‌ها توسط پلیت سانتریفوژ کاملاً سانتریفوژ شد. به این ترتیب محتویات داخل هر چاهک کاملاً رسوب کرد، سپس تمامی محتویات مایع روی سلول‌ها دور ریخته و بلافاصله ۱۰۰ میکرولیتر محیط جدید بدون سرم به سلول‌ها اضافه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه گردید. پس از ۳ ساعت انکوباسیون کل محتویات روی سلول‌ها را دور ریخته و بلافاصله ۱۰۰ میکرولیتر محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO) به هر چاهک اضافه شد تا کریستال‌های فورمازان حل شود. در نهایت جذب نوری محلول به‌دست آمده در طول موج ۵۸۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا قرائت شد.

مطالعه‌ی آپتوز با میکروسکوپ فلورسنت: جهت بررسی تغییرات ریخت شناسی آپتوز در ابتدا به‌طور جداگانه استوک ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رنگ آکریدین اورنج و استوک ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رنگ اتیدیوم بروماید در PBS تهیه شد. محلول‌های فوق به نسبت ۱:۱ حجمی - حجمی مخلوط شدند، سپس ۰/۵ میکرولیتر از محلول حاصل با ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی روی لام میکروسکوپی مخلوط شد. بعد از تهیه‌ی اسمیر، سلول‌ها با

تغییرات ایجاد شده بر اثر $N-TiO_2$ در حضور نور مرئی شامل مهار رشد این سلول‌ها و خارج شدن این سلول‌ها از شکل طبیعی می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود اجسام آپوتوتیک و سلول‌های مرده قابل تشخیص می‌باشند.

تغییرات ظاهری ۲۴ ساعت پس از تیمار با $N-TiO_2$ به صورت وابسته به غلظت آغاز شد و در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین میزان این تغییرات مشخص شد. سلول‌های A-375 به‌طور طبیعی به فرم اپیتلیالی هستند، به‌ترتیبی که در شکل ۱ مشاهده می‌شود،



شکل ۱؛ تغییرات ظاهری سلول‌های A-375 تیمار شده با $N-TiO_2$ بعد از ۲۴ ساعت با میکروسکوپ نوری معکوس و بزرگ نمایی ۳۲×، بعد از ۲۴ ساعت مهار رشد سلولی و تشکیل اجسام آپوتوتیک دیده شد. سلول‌های A-375 در حالت طبیعی به فرم اپیتلیالی و چسبنده هستند، زمانی که در معرض غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره قرار می‌گیرند از سطح جدا شده و به فرم کروی در می‌آیند.

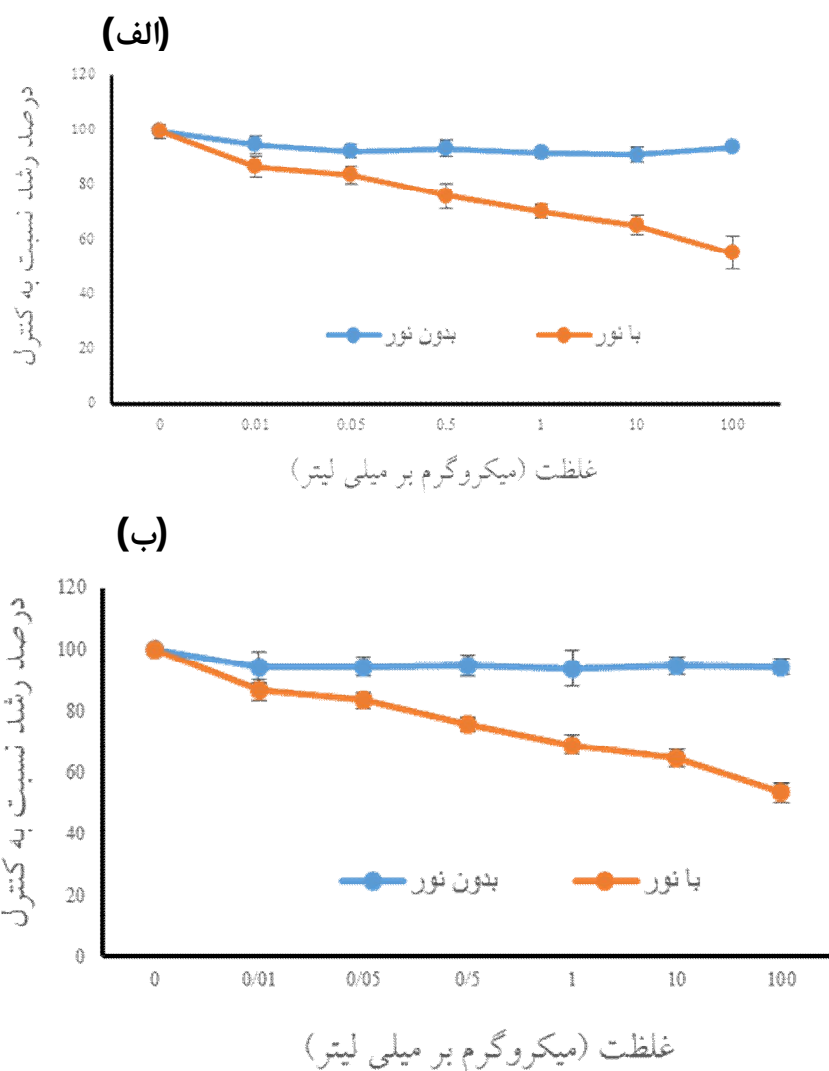
القا مرگ در سلول‌های A-375 در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌شود و در غلظت‌های دیگر کاهش چشمگیری مشاهده نمی‌شود. نتایج حاصل برای غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در ۲۴ ساعت میزان زیستایی برابر با ۷۲/۳ درصد نسبت به کنترل (شکل ۳-الف) و در ۴۸ ساعت برابر ۶۷/۳ درصد نسبت به کنترل نشان داد (شکل ۳-ب).

به منظور بررسی اثرات سمی $N-TiO_2$ بر سلول‌های A-375 و تایید نتایج به دست آمده از شمارش سلولی از آزمون MTT استفاده شد. به‌طور کلی از آزمون MTT برای اندازه‌گیری سمیت و تکثیر سلولی استفاده می‌شود. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است تا اندازه‌ای شاهد کاهش رشد هستیم به خصوص در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، اما نتایج آزمون تریپان بلو در آزمون MTT تکرار

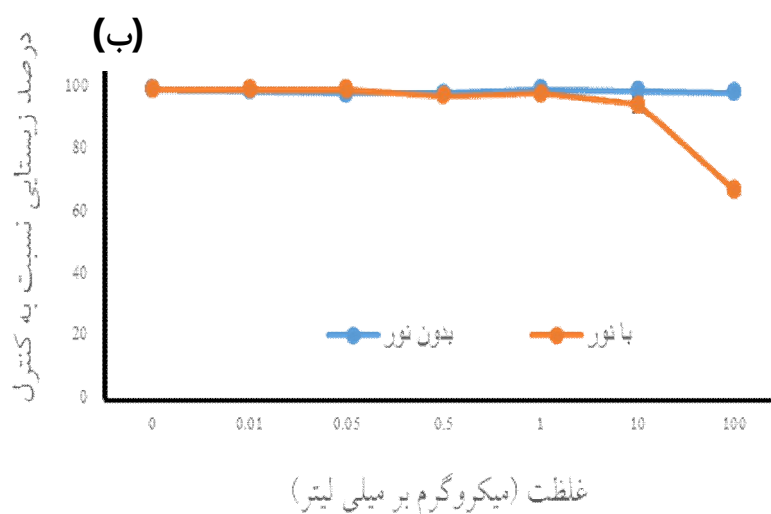
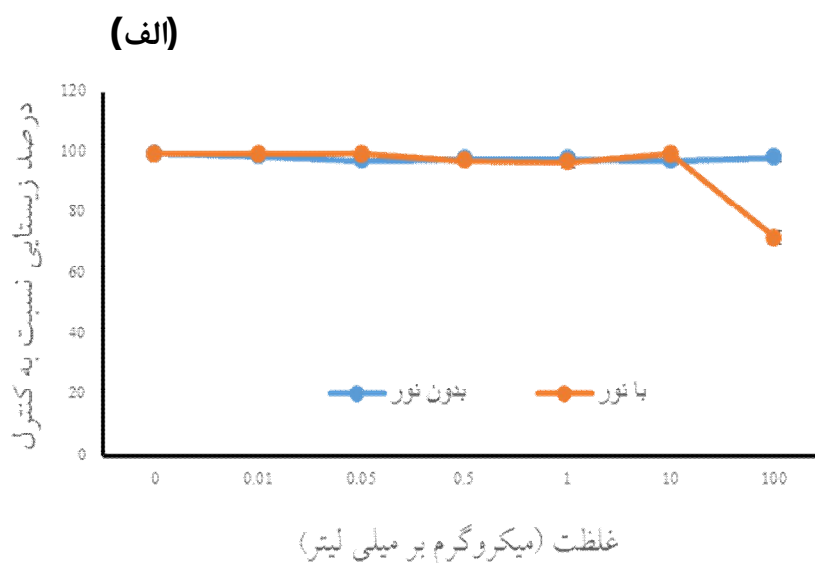
$N-TiO_2$ فعال شده توسط نور سبب مهار رشد و زیستایی در سلول‌های A-375 می‌گردد. برای بررسی اثرات $N-TiO_2$ در حضور نور مرئی بر رشد و تکثیر سلول‌ها از آزمون دفع رنگ تریپان بلو استفاده گردید. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، اثر مهار رشدی $N-TiO_2$ بر روی سلول‌های A-375 تنها وابسته به غلظت بوده و زمان بر روی آن تاثیر چشمگیری ندارد. نتایج برای غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت بین ۱۰۰ تا ۵۵/۶ درصد نسبت به کنترل می‌باشد (شکل ۲-الف) و در ۴۸ ساعت بین ۱۰۰ تا ۵۳/۶ درصد نسبت به کنترل می‌باشد (شکل ۲-ب). میزان زیستایی این سلول‌ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۳). نتایج حاصل از آزمون تریپان بلو نشان داد که $N-TiO_2$ در حضور نور مرئی سبب کاهش زیستایی و

تترازولیوم و کریستال‌های فورمازان که انتظار می‌رود در تست MTT شکل بگیرد نامتناسب است (۲۷). N-TiO₂ فعال شده توسط نور سبب القای آپوپتوز در سلول‌های A-375 می‌گردد.

نمی‌شود، که مهم‌ترین دلیل آن این است که نانوذره N-TiO₂ در حضور نور مرئی رادیکال آزاد اکسیژن (O₂⁻) تولید می‌کند که در نتایج تست MTT اختلال ایجاد می‌کند. بر اثر انتقال الکترون از O₂⁻ به MTT یک رادیکال حد واسطه به نام رادیکال تترازولینیل تشکیل می‌شود که کاملاً با نمک



شکل ۲: بررسی اثر N-TiO₂ تحت تاثیر نور مرئی بر رشد سلول‌های A-375 با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو. (الف) اثر N-TiO₂ در کاهش رشد سلول‌های A-375 بعد از ۲۴ ساعت به صورت وابسته به غلظت (۰/۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) سبب کاهش رشد و تکثیر سلولی می‌شود. (ب) اثر N-TiO₂ در کاهش رشد سلول A-375 بعد از ۴۸ ساعت به صورت وابسته به غلظت (۰/۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) سبب کاهش رشد و تکثیر سلولی می‌شود. مقادیر ارایه شده در نمودار به صورت میانگین سه واکنش مستقل $\pm$ خطای استاندارد (SD) می‌باشد.

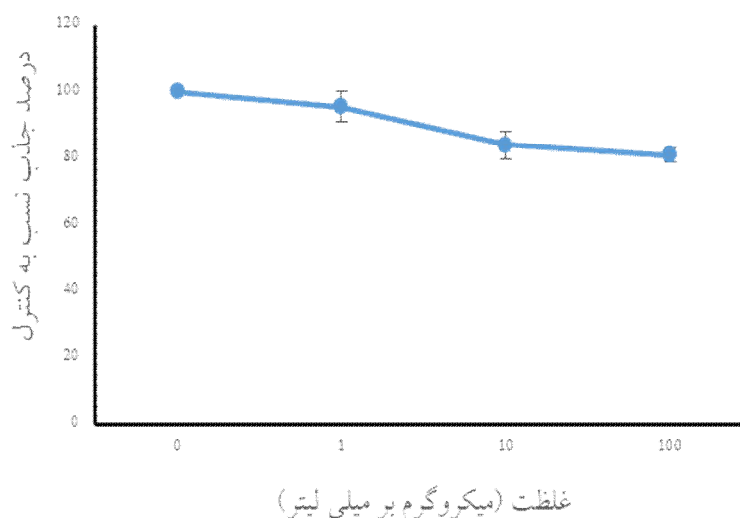


شکل ۳، بررسی اثر $N-TiO_2$ تحت تاثیر نور مرئی بر زیستایی سلول‌های A-375 با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو.

الف) اثر $N-TiO_2$ در زیستایی سلول‌های A-375 بعد از ۲۴ ساعت، ب) اثر $N-TiO_2$ در زیستایی سلول‌های A-375 بعد از ۴۸ ساعت. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه واکنش مستقل $\pm$ خطای استاندارد (SD) می‌باشد.

۲۴ ساعت به شکل سلول‌هایی با کروماتین نارنجی دیده می‌شوند که نشان دهنده مرگ سلولی از نوع آپوپتوز است و سلول‌های کنترل به رنگ سبز دیده می‌شوند (شکل ۵-الف)

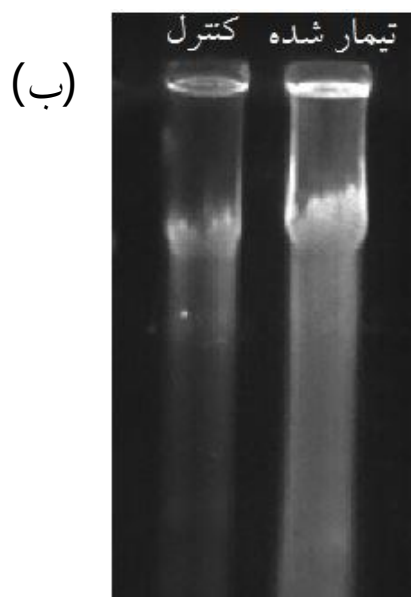
همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و رنگ Ao/Et سلول‌های تیمار شده با $N-TiO_2$ در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از



شکل ۴: بررسی اثرات سمی $N-TiO_2$ بر سلول‌های A-375 بعد از ۴۸ ساعت با استفاده از آزمون MTT، تغییرات به صورت وابسته به غلظت (۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) است. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین دو واکنش مستقل $\pm$ خطای استاندارد (SD) می‌باشد.

وقوع آپوپتوز در این سلول‌ها و عدم وقوع آن در سلول‌های کنترل بودیم (شکل ۵-ب).

همچنین بر اساس نتایج حاصل از آزمون قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های A-375 تحت تیمار با $N-TiO_2$ در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شاهد



(ب)



(الف)



شکل ۵: (الف) بررسی اثر آپوپتوتیک $N-TiO_2$ تحت تاثیر نور مرئی بر سلول‌های A-375 با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و رنگ‌آمیزی Ao/Et (ب) بررسی اثر آپوپتوتیک $N-TiO_2$ تحت تاثیر نور مرئی بر سلول‌های A-375 با استفاده از آزمون قطعه قطعه شدن DNA. پس از ۲۴ ساعت در سلول‌های A-375 تحت تیمار با $N-TiO_2$ در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حالت لکه (Smear) مشاهده شد که حاکی از وقوع آپوپتوز در این سلول‌ها و عدم وقوع آن در سلول‌های کنترل می‌باشد.

بحث

تومور بدخیم پوست با منشأ ملانوسیتی ملانوم بدخیم نام دارد که نوع ملانومایی سرطان پوست است و احتمال متاستاز دادن آن بیشتر از دیگر سرطان‌های پوستی می‌باشد (۲۸). فوتودینامیک تراپی یک روش غیر تهاجمی است که در درمان ملانوما بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۵ و ۶). با توجه به اهمیت اخیر کاربرد نانوذرات از قبیل TiO_2 به عنوان حساسگر نوری در تکنیک فوتودینامیک تراپی، ما بر آن شدیم تا مکانیسم اثر یک فرم فعال تر از نظر خاصیت نوری و آنتی اکسیدانی را بررسی کنیم. مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی مکانیسم‌های مولکولی اثرات سمی N-TiO_2 به عنوان یک حساسگر نوری تحت تاثیر نور مرئی بر روی رده‌ی سلولی A-375 ملانومای انسانی صورت پذیرفت. تکنیک درمانی مورد استفاده در این مطالعه تکنیک فوتودینامیک تراپی است که بیشتر در مورد سرطان‌های سطحی مثل سرطان پوست پاسخگو می‌باشد. به همین علت رده‌ی سلولی انتخابی برای این مطالعه، رده‌ی سلولی سرطان پوست از نوع ملانوما می‌باشد. در این مطالعه مشخص شد که نانوذرات N-TiO_2 در حضور نور مرئی سبب مهار رشد و زیستایی به صورت وابسته به غلظت در سلول‌های A-375 گردیدند. در مطالعه‌ای که توسط جانگ وونگ سو و همکاران انجام شد، تاثیر TiO_2 در حضور UV بر رده‌ی سلولی A-375 بررسی گردید. یافته‌ها نشان داد که در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر مهار رشدی مشاهده می‌شود، این اثر مهار رشدی با تغییر در شکل ظاهری این سلول‌ها همراه بود (۲۹). ینگ و همکاران نشان دادند اثرات مهار رشدی در سلول‌های L-02 و Bel-7402 که تحت تاثیر TiO_2 قرار گرفتند به ترتیب پس از ۴۸ و ۹۶ ساعت مشاهده می‌شود، در حالی که در آزمایش حاضر این اثر پس از گذشت ۲۴ ساعت مشاهده شد (۳۰). در مطالعه‌ی دیگری که روی سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-468 (کارسینومای سینه) صورت

گرفت نشان داده شد TiO_2 در حضور اشعه‌ی فرابنفش (UV) در غلظت‌های ۵ تا ۴۵ میکرومولار به صورت وابسته به غلظت موجب مهار رشد در این سلول‌ها می‌شود (۱۴). همچنین در مطالعه‌ای که توسط موسوی و همکاران بر روی رده‌ی سلولی K562 لوسمی انسان صورت گرفت نشان داده شد که N-TiO_2 در غلظت‌های ۰/۱ تا ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت وابسته به غلظت و زمان سبب مهار رشد و تغییر در شکل ظاهری این سلول‌ها می‌شود (۲۵). در مطالعه‌ی حاضر اثر مهار رشدی در غلظت‌های ۰/۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر همراه با تغییر در شکل ظاهری این سلول‌ها مشاهده شد. به علاوه نتایج حاصل از میکروسکوپ فلورسنت و همچنین آزمون قطعه قطعه شدن DNA نشان داد که اثرات N-TiO_2 بر مهار زیستایی سلول‌های A-375 به واسطه‌ی القای آپوپتوز صورت می‌گیرد. در مطالعه‌ای که توسط ژنگ لی و همکاران صورت گرفت، با بررسی تاثیر N-TiO_2 و TiO_2 بر روی رده‌های سلولی Hela (کارسینومای دهانه رحم)، QGY (کارسینومای کبد) و KB (کارسینومای نازوفارنکس) بعد از اینکه سلول‌ها در معرض نور مرئی قرار گرفتند، سلول‌هایی که با N-TiO_2 تیمار شدند با شدت خیلی بیشتری نسبت به سلول‌هایی که با TiO_2 تیمار گردیدند کشته شدند، که البته این اثر کاملاً وابسته به غلظت است و در آخر نتیجه گرفتند که می‌توان از N-TiO_2 به عنوان یک حساسگر نوری کار آمد در درمان انواع مختلف سرطان‌ها استفاده کرد (۲۰). همچنین در مطالعه‌ای که توسط موسوی و همکاران بر روی رده‌ی سلولی K562 صورت گرفت نشان داده شد که N-TiO_2 در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حضور نور مرئی سبب القای آپوپتوز می‌شود و در این غلظت کاهش زیستایی تا ۶۰ درصد گزارش شد (۲۵). همچنین مطالعات صورت گرفته بر روی سلول‌های H1299 سرطان ریه حاک از القای آپوپتوز در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر TiO_2 بود (۱۷). ثابت شده است که TiO_2 در

کاهش خصلت بازترکیبی این نانوذره می‌باشد (۲۲).

نتیجه گیری

با توجه به عملکرد موثر N-TiO₂ در مهار رشد و زیستایی و القای آپوپتوز در سلول‌های A-375 ملانومای انسانی، استفاده از این نانوذرات به‌عنوان یک حساسگر نوری بالقوه با خواص فوتوکاتالیتیکی قوی برای ارزیابی بیشتر به‌عنوان یک حساسگر نوری ارتقا یافته در درمان فوتوکاتالیتیکی ملانوما می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. همچنین بررسی اثر نانوذرات N-TiO₂ در شرایط *In vivo* جهت بررسی امکان کاربردهای بالینی آن پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از صندوق حمایت از پژوهشگران کشور، نهاد ریاست جمهوری برای طرح شماره‌ی ۹۲۰۳۰۱۰۲ ابراز می‌دارند. این طرح طی قرارداد شماره ۹۴۰۵۲۴-I-۵۰۶ پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری صورت گرفته است.

References

- 1- Leiter U, Garbe C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer-the role of sunlight. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 624: 89-103.
- 2- Marks R. An overview of skin cancers. *Cancer*. 1995; 75: 607-12.
- 3- Mortazavi F, Abdolmaleki K, Samety A, Hashemian A, Haghjooy Javanmard S. The role of heme oxygenase -1 system in melanoma tumor growth of C57Bl/6 mice. *J Zanzan Univ Med Sci*. 2014; 22: 52-60.

حضور UV موجب القای آپوپتوز در سلول‌های A-375 می‌گردد (۲۹). القای آپوپتوز در رده‌ی سلولی MDA-MB-468 توسط TiO₂ در حضور UV نیز به اثبات رسیده است (۱۴). یکی از راه‌های فرار از سرطانی شدن سلول‌ها آپوپتوز است و هرگونه اختلال در این فرآیند منجر به سرطانی شدن سلول‌ها می‌گردد. بدین منظور القای آپوپتوز در سلول‌های A-375 توسط N-TiO₂ در حضور نور مرئی به واسطه‌ی تولید ROS رخ می‌دهد. القای آپوپتوز به واسطه‌ی استرس اکسیداتیو می‌باشد. استرس اکسیداتیو زمانی روی می‌دهد که تولید ROS بیش از ظرفیت حفاظت بخشی دفاع‌های آنتی‌اکسیدانی باشد (۳۱). در مطالعه‌ی صورت گرفته کاربرد N-TiO₂ به‌منظور افزایش استرس اکسیداتیو و در نتیجه القای مرگ سلولی به‌عنوان راهکار جدید در از بین بردن سرطان مطرح می‌باشد. همان‌طور که بیان شد نانوذرات TiO₂ تحت تاثیر اشعه‌ی UV برانگیخته می‌شوند، از آنجا که این طول موج برای بدن مضر است و امکان بازترکیبی الکترون-حفره وجود دارد، ناخالص سازی TiO₂ با نیتروژن یکی از راه‌های اصلاح خواص فوتوکاتالیتیکی و

- 4- Retsas S. Adjuvant therapy of malignant melanoma: is there a choice? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2001; 40: 187-93.
- 5- Jhappan C, Noonan FP, Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene*. 2003; 22: 3099-112.
- 6- Wan MT, Lin JY. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014; 7: 145-63.
- 7- Choudhary S, Nouri K, Elsaie ML.

- Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers Med Sci.* 2009; 24: 971-80.
- 8- Zhao B, He Y-Y. Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2010; 10: 1797-809.
- 9- Li Z, Pan X, Wang T, Wang P-N, Chen J-Y, Mi L. Comparison of the killing effects between nitrogen-doped and pure TiO₂ on HeLa cells with visible light irradiation. *Nanoscale res lett.* 2013; 8: 96.
- 10- Hayati Roodbari N, Parivar P, Badiei B, Zolfaghari Barogh S. Cytotoxic effects of nano-titanium dioxide on forelimb bud development in NMRI Mouse Embryos In vivo. *J Zanzan Univ Med Sci.* 2014; 22: 11-24.
- 11- Nakata K, Fujishima A. TiO₂ photocatalysis: design and applications. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev.* 2012; 13: 169-89.
- 12- Yin ZF, Wu L, Yang HG, Su YH. Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide. *Phys Chem Chem Phys.* 2013; 15: 4844-58.
- 13- Fujishima A, Ohtsuki J, Yamashita T, Hayakawa S. Behavior of tumor cells on photoexcited semiconductor surface. *Photomed Photobiol.* 1986; 8: 45-6.
- 14- Lagopati N, Tsilibary E-P, Falaras P, et al. Effect of nanostructured TiO₂ crystal phase on photoinduced apoptosis of breast cancer epithelial cells. *Int J Nanomedicine.* 2014; 9: 3219- 30.
- 15- Zhang S, Yang D, Jing D, et al. Enhanced photodynamic therapy of mixed phase TiO₂ (B)/anatase nanofibers for killing of heLa cells. *Nano Res.* 2014; 7: 1659-69.
- 16- Wang JJ, Sanderson BJ, Wang H. Cyto-and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutat Res.* 2007; 628: 99-106.
- 17- Lee YS, Yoon S, Yoon HJ, 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.
- 18- Kubota Y, Shuin T, Kawasaki C, et al. Photokilling of T-24 human bladder cancer cells with titanium dioxide. *Br J Cancer.* 1994; 70: 1107.
- 19- Zhang AP, Sun YP. Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 2004; 10: 3191-3.
- 20- Li Z, Mi L, Wang P-N, Chen J-Y. Study on the visible-light-induced photokilling effect of nitrogen-doped TiO₂ nanoparticles on cancer cells. *Nanoscale Res Lett.* 2011; 6: 356.
- 21- Khataee A, Zarei M, Fathinia M, Jafari MK. 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.
- 22- Byrne JA, Fernandez-Ibanez PA, Dunlop PS, Alrousan D, Hamilton JW. Photocatalytic enhancement for solar disinfection of water: a review. *Int J Photoenergy.* 2011; 2011: 798051.

- 23- Zaleska A. Doped-TiO₂: a review. *Recent Patents on Engineering*. 2008; 2: 157-64.
- 24- Asahi R, Morikawa T, Ohwaki T, Aoki K, Taga Y. Visible-light photocatalysis in nitrogen-doped titanium oxides. *Science*. 2001; 293: 269-71.
- 25- Moosavi SMA, Khataee A, Moasses Ghafari S. Study of the photocatalytic effects of nitrogen-doped titanium dioxide nanoparticles on growth inhibition and apoptosis induction in K562 cell line. *Sci J Kurdistan Uni Med Sci*. 2013; 18: 47-58.
- 26- Khataee A, Zarei M, Moradkhannejhad L, Nourie S, Vahid B. Nitrogen doping of commercial TiO₂ nanoparticles for enhanced photocatalytic degradation of dye under visible light: Central composite design approach. *Adv Chem Lett*. 2013; 1: 24-31.
- 27- Wang S, Yu H, Wickliffe JK. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicol In Vitro*. 2011; 25: 2147-51.
- 28- Wechter ME, Reynolds RK, Haefner HK, et al. Vulvar melanoma: review of diagnosis, staging, and therapy. *J Low Genit Tract Dis*. 2004; 8: 58-69.
- 29- Seo Jw, Chung H, Kim My, Lee J, Choi Ih, Cheon J. Development of water - soluble single - crystalline TiO₂ nanoparticles for photocatalytic cancer-cell treatment. *Small*. 2007; 3: 850-3.
- 30- Xian ying C, Hong lian D, Yu hua Y, Shi pu L. Selective anti-hepatoma treated with titanium oxide nanoparticles in vitro. *J Wuhan Uni Technol Sci Ed*. 2003; 1: 52-4.
- 31- Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways. *Exp Gerontol*. 2010; 45: 217-34.

Effect of Nitrogen-Nano Doped of Titanium Dioxide in Human A-375 Melanoma Cancer Cell Line

Sharifi M¹, Moosavi MA², Naji T¹

¹Dept. of Cell & Molecular Biology, Islamic Azad University Pharmaceutical Sciences Branch, Tehran, Iran.

²Division of Medical Biotechnology, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Moosavi MA, Dept. of Molecular Medicine, Institute of Medical Biotechnology, National Institute of Genetics Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

E-mail: a-moosavi@nigeb.ac.ir

Received: 9 Jan 2016 **Accepted:** 6 Jun 2016

Backgrounds and Objective: Titanium dioxide (TiO₂) is a potent photosensitizer in photodynamic therapy (PDT) and is activated upon ultraviolet (UV) irradiation. The aim of this study was the assessment of the effect of nitrogen –nano doped of titanium dioxide in human A-375 melanoma cancer cell line.

Materials and Methods: N-TiO₂ nanoparticles were prepared by mechanical mixing of urea with TiO₂ powder in a 4:1 weight ratio. A-375 cells were treated with different concentrations of N-TiO₂ for various time intervals in the presence or absence of visible light. The growth and viability of A-375 cells were determined by means of trypan blue exclusion test and MTT assay, respectively. Acridine orange/Ethidium bromide double staining and DNA gel electrophoresis were applied to determine apoptosis.

Results: The results showed that visible light activated N-TiO₂ could induce growth inhibition in a dose (0.01-100 µg/ml) and time dependent manner. Decrease in viability was observed in 100 µg/ml concentration and the results of fluorescent microscopy showed DNA fragmentation due to apoptotic cell death at this concentration.

Conclusion: Based on the anti-cancer effects of N-TiO₂ on A-375 cells, further evaluation of these nanoparticles as a new photosensitizer in photocatalytic therapy of skin cancer can be proposed.

Keywords: Melanoma, Nitrogen doping, Photodynamic therapy, Titanium dioxide