

Sadaf Hajjaran<sup>1</sup>, Seyed  
Mohammad Amin Moosavi<sup>2\*</sup>,  
Mina Ramezani<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Master of Science in  
Developmental Biology,  
Department of Biology,  
Central Tehran Branch,  
Islamic Azad University,  
Tehran, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor of  
Molecular Medicine,  
Department of Molecular  
Medicine, Institute of Medical  
Biotechnology, National  
Institute for Genetic  
Engineering and  
Biotechnology, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Associate professor of  
Developmental Biology,  
Department of Biology,  
Central Tehran Branch,  
Islamic Azad University,  
Tehran, Iran

## Evaluating Effects of Nitrogen-Doped-Titanium Dioxide in Photodynamic Therapy of Breast Cancer MCF-7 Cells

Received: 1 Oct 2017 ; Accepted: 23 Oct 2017

### Abstract

**Background:** Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles (NPs) activated by ultraviolet light (UV) have been recently proposed as a nano-photosensitizer (PS) for cancer therapy. However, because adverse effects of UV light, other doped-TiO<sub>2</sub> NPs with ability of activation by safe light sources, such as visible light, have been recommended for photodynamic therapy (PDT) purposes. The aim of this study is to evaluate effects of photodynamic N-TiO<sub>2</sub> NPs in MCF-7 cell line as human epithelial breast cancer cell line.

**Methods:** MCF-7 cells were treated with different concentrations of N-TiO<sub>2</sub> NPs and a visible light source was used for their photocatalytic activation. Trypan blue staining was performed to investigate the rate of cell viability and cell growth at 24h and 48h upon irradiation. Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EtBr) staining and deoxyribonucleic acid (DNA)-laddering assay were used for detecting the mode of cell death.

**Results:** Treatment of MCF-7 cells with N-TiO<sub>2</sub> NPs, up to 100 µg/ml was inert and did not significantly affect growth and viability. However, with the increasing at concentrations of NP, the rate of cell death increased considerably upon visible-light irradiation. The AO/EtBr double staining and DNA-ladder assay showed that the mode of cell death induced by photodynamic N-TiO<sub>2</sub> NPs is mostly through apoptosis.

**Conclusion:** N-TiO<sub>2</sub> NPs in conjugation with visible-light may be proposed as a safe approach for PDT of breast cancer cells.

**Keywords:** Apoptosis, Breast Cancer, Nanoparticles, Nitrogen-doped, Titanium dioxide

**\*Corresponding Author:**  
Department of Molecular Medicine,  
Institute of Medical Biotechnology,  
National Institute for Genetic  
Engineering and Biotechnology,  
Tehran, Iran

Tel: 0912- 0931693  
E-mail: a-moosavi@nigeb.ac.ir

## بررسی تأثیرات نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید دوپه شده با نیتروژن در فتودینامیک تراپی سلول‌های MCF-7 سرطان پستان

صدف حجاران<sup>۱</sup>، سید محمد امین موسوی<sup>۲\*</sup>، مینا رمضانی

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی تکوینی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار گروه زیست‌فناوری پزشکی، گروه پزشکی مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران  
<sup>۳</sup> دکترای تخصصی زیست‌شناسی سلولی و تکوینی، دانشیار زیست‌شناسی سلولی و تکوینی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۷/۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱

### چکیده

**زمینه و هدف:** اخیراً، نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید ( $\text{TiO}_2$ ) با قابلیت فعالیت نوری تحت نور فرا بنفش به عنوان یک نانوحساسگر نوری (nano-photosensitizer) برای سرطان پیشنهاد شده‌اند. با این حال، به علت مضرات پرتوهای فرابنفش نانوذرات ارتقا یافته دیگری برپایه  $\text{TiO}_2$  با توانایی فعال شدن با منبع نور ایمن‌تری مثل نور مرئی برای فتودینامیک تراپی (photodynamic therapy) توصیه شده‌اند. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات فتودینامیک نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید دوپه شده با نیتروژن ( $\text{N-TiO}_2$ ) بر رده سلولی MCF-7 به عنوان سلول‌های اپیتلیالی سرطان پستان انسانی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف از نانوذرات  $\text{N-TiO}_2$  تیمار شده و به منظور تحریک فعالیت فتوکاتالیکی، تحت تابش با یک منبع نور مرئی قرار گرفتند. آزمون دفع رنگ تریپان بلو برای بررسی میزان زیستایی و رشد سلولی، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تابش نور انجام شد. رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتیديوم بروماید (AO/EtBr) و آزمون قطعه قطعه شدن DNA برای تشخیص نوع مرگ سلولی استفاده شد.

**یافته‌ها:** تیمار سلول‌های MCF-7 با نانوذرات  $\text{N-TiO}_2$  تا غلظت  $100 \mu\text{g/ml}$  تأثیر قابل توجهی روی رشد و زیستایی نداشت. در حالی که در حضور نور مرئی با افزایش غلظت، میزان مرگ سلولی به طور قابل توجهی افزایش یافت. رنگ آمیزی AO/EtBr و آزمون قطعه قطعه شدن DNA نشان داد که نوع مرگ سلولی القا شده توسط نانوذرات  $\text{N-TiO}_2$  بر اساس PDT عمدتاً از طریق آپوپتوز است.

**نتیجه‌گیری:** نانوذرات  $\text{N-TiO}_2$  همراه با نور مرئی می‌توانند به عنوان یک نانوحساسگر ایمن در فتودینامیک تراپی سلول‌های سرطانی پستان پیشنهاد شود.

**کلمات کلیدی:** آپوپتوز، سرطان پستان، نانوذرات، دوپه کردن با نیتروژن، تیتانیوم دیاکسید

### \*نویسنده مسئول:

گروه زیست‌فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران

۰۹۱۲۰۹۳۱۶۹۳

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

## مقدمه

سرطان یک مشکل اساسی در ایران و دیگر کشورهای جهان است. به طور تقریبی ۱۴ میلیون مورد جدید سرطان و ۲/۲ میلیون مرگ ناشی از سرطان سالیانه به صورت جهانی اتفاق می‌افتد.<sup>۱</sup> سرطان پستان دومین سرطان رایج بعد از سرطان ریه در بین زنان ایرانی می‌باشد. همین‌طور میزان شیوع و نرخ مرگ و میر ناشی از سرطان پستان در بین زنان ایرانی علی‌رغم وجود راهکارهای درمانی بیشمار رو به افزایش است.<sup>۲</sup> جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی، هورمون‌درمانی و یا ترکیب این موارد از جمله معمول‌ترین روش‌های درمانی سرطان پستان هستند که به دلیل اختصاصی نبودن، عوارض جانبی شدیدی ایجاد می‌کنند؛ همچنین باعث متاستاز، بازگشت تومور و ایجاد تومورهای ثانویه در بافت پستان می‌شوند.<sup>۲-۷</sup> بنابراین ضرورت ایجاد سیستمی برای رساندن دارو به بافت توموری بدون عوارض جانبی احساس می‌شود. نانوتکنولوژی یک شاخه به سرعت در حال رشد است که به طور گسترده‌ای در زمینه‌های مختلف از جمله پزشکی مورد توجه قرار گرفته است و نشان داده شده است که نانوذرات به واسطه ویژگی‌های فوق‌العاده‌شان مثل اندازه کوچک و نسبت بالای سطح به حجم، قادر به کاهش موانع موجود در استفاده از درمان‌های معمول سرطان هستند.<sup>۵-۱۱</sup> نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید (TiO<sub>2</sub>) به دلیل ویژگی‌هایی از قبیل غیرسمی بودن، جذب نوری فوق‌العاده، هزینه پایین و پایداری شیمیایی بالا به طور گسترده‌ای در زمینه‌های مختلفی از جمله پزشکی مورد توجه قرار گرفته‌اند.<sup>۱۲</sup> TiO<sub>2</sub> یک نیمه رسانا است که نتایج نوید بخشی را در کشندگی نوری سلول‌های سرطانی به دلیل فعالیت نوری فوق‌العاده‌اش نشان داده است.<sup>۷-۲۲، ۱۳</sup> TiO<sub>2</sub> اثرات خود بر روی مرگ سلولی را در فرایندی که فتودینامیک تراپی (PDT) نامیده می‌شود، القا می‌کند که شامل تعامل مشترک نور، حساس‌گر نوری (PS) و جفت الکترون-حفره است که منجر به ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و در نتیجه سبب مرگ سلولی از طریق آپوپتوز، نکروز یا اتوفاجی می‌شود.<sup>۱۳، ۲۴</sup> TiO<sub>2</sub> ارزان، زیست سازگار و دارای پایداری بالا در محلول است، اما تنها مشکل اساسی در کاربرد درمانی این نانوذره انرژی بالای شکاف پیوند آن (۳/۲ الکترون ولت) است که باعث می‌شود این نیمه رسانا

تحت تابش نور ماوراء بنفش (UV) اثرات خود را القا کند.<sup>۲۵، ۲۶</sup> از این‌رو، راهکارهای جدیدی به منظور کاهش انرژی شکاف پیوند این نانوذره و فعالیتش در حضور نور مرئی به کار گرفته شده است. دوپه کردن با کاتیون‌ها یا آنیون‌ها دستاورد مهمی در کاهش انرژی شکاف باند نانوذرات TiO<sub>2</sub> است.<sup>۲۷</sup> احتمال تشکیل مراکز نوترکیبی توسط آنیون‌ها کمتر از کاتیون‌ها است.<sup>۲۶</sup> Asahi و همکاران برای اولین بار نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید دوپه شده با نیتروژن (N-TiO<sub>2</sub>) را سنتز کردند و نشان دادند که نیتروژن (N) نسبت به دیگر آنیون‌ها (کربن، فلور، فسفر و گوگرد) به میزان بیشتری قادر به کاهش انرژی شکاف پیوند نانوذرات TiO<sub>2</sub> می‌باشد.<sup>۲۸</sup> با توجه به عدم موفقیت کامل درمان‌های موجود در درمان سرطان پستان و از طرفی فقدان مطالعه جامع و کاملی پیرامون تاثیرات نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> بر روی مهار رشد و مرگ سلولی سلول‌های سرطان پستان، هدف از این مطالعه بررسی تاثیرات نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید دوپه شده با نیتروژن به تنهایی یا زمانی که با نور مرئی فعال می‌شوند، بر کاهش میزان زیستایی و مرگ سلولی سلول‌های MCF-7 به عنوان سلول‌های اپیتلیال سرطان پستان انسانی است.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی - آزمایشگاهی بوده است.

## مواد

محیط کشت DMEM تهیه شده از شرکت Biosera (East Sussex, UK)، سرم جنین گاوی (FBS)، رنگ تریپان بلو، تریس (Tris-HCl)، آکریدین اورنج/تیدیوم بروماید (EtBr/AO) و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) از شرکت سیگما آمریکا تهیه شدند. پودر TiO<sub>2</sub> خالص (anatase, Cotiox KA-100) < ۹۹٪ و اوره به ترتیب از شرکت‌های Coteix کره جنوبی و Merck آلمان تهیه شدند. پنی سیلین و استرپتومایسین و همین‌طور پروتئیناز K از شرکت سیناژن (تهران-ایران) خریداری شدند. فلاسک‌های کشت سلول از شرکت SPL Life Science (کره جنوبی) تهیه شدند.

## روش بررسی

شده تحت تابش لامپ زنون ۵۰ وات (به عنوان منبع نور مرئی) به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. جهت حذف امواج UV از فیلتر ۴۰۰ نانومتر استفاده شد.

### بررسی رشد و زیستایی سلول‌ها با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو

تعداد  $2 \times 10^5$  سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت ۲۴ چاهکی استریل شده با اشعه گاما ریخته و با غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در دو گروه تیمار شدند. یک گروه ۴-۲ ساعت پس از تیمار، تحت تابش نور مرئی قرار گرفت و یک گروه در شرایط تاریکی باقی ماند. بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از تیمار تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده از لام هموسایتومتر و رنگ تریپان بلو توسط میکروسکوپ نوری (ZEISS, Germany) شمارش شد و سلول‌های زنده همان‌طور که قبلاً گزارش شده بود مشخص شدند<sup>۲۹</sup>.

### بررسی ریخت‌شناسی سلول‌ها

به منظور بررسی تغییرات ایجاد شده در سلول‌های MCF-7 بعد از تیمار با غلظت‌هایی که باعث ۵۰٪ مهار رشد می‌شوند، تعداد  $2 \times 10^5$  سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت ۲۴ چاهکی کشت داده شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت طبق شرایط گفته شده سلول‌ها تیمار شدند و بعد از گذشت مدت زمان مورد نظر، تغییرات ریخت‌شناسی توسط میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus, Japan) بررسی شد.

### بررسی مرگ سلولی با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس

پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف و گذشت مدت زمان مورد نظر از تیمار، مقدار ۲۰ μl از سوسپانسیون سلولی با ۵ μl از محلول آکریدین اورنج/تیدایوم بروماید روی لام میکروسکوپی مخلوط شد. بعد از تهیه اسمیر سلول‌ها را با لامل پوشانده و سپس با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد.

### آماده‌سازی و تعیین مشخصات نانوذرات N-TiO<sub>2</sub>

آماده‌سازی نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> به طور کامل در مطالعه قبلی ما توضیح داده شد<sup>۲۹</sup>. مخلوط کردن مکانیکی اوره با پودر TiO<sub>2</sub> در فرم آناتاز در یک نسبت ۴:۱ منجر به ایجاد نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> می‌شود<sup>۳۰</sup>. آناتاز بودن نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> و همچنین اندازه این نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی گزاره (TEM)، (CM 120, Philips, Germany) تایید شد. اندازه‌ی نانوذرات از طریق روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS) مشخص شد که توسط دستگاه DLS (Zetaplus شرکت Brookhaven آمریکا) انجام شد. برای این منظور ابتدا استوک ۱ mg/ml از نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در آب دیونیزه یا محیط کشت (با یا بدون FBS) تهیه شد. سپس غلظت‌های ۱-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در آب دیونیزه، محیط کشت و محیط کشت همراه با ۱۰٪ حجمی/حجمی FBS برای آنالیزهای DLS تهیه شدند.

### کشت سلول

سلول‌های اپیتلیالی سرطان پستان انسانی، رده‌ی سلولی MCF-7، از بانک سلولی ایران (انستیتو پاستور ایران) تهیه شد. در محیط کشت DMEM غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گاو و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (۱۰۰ μg/ml) و پنی‌سیلین (۱۰۰ U/ml) و در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO<sub>2</sub>، رطوبت ۹۵٪ و دمای ۳۷°C قرار گرفتند. در ادامه بعد از ۴۸ ساعت، تعویض محیط کشت و پاساژ به منظور انجام تست‌های بعدی انجام شد.

### تیمار سلول‌ها با نانوذرات N-TiO<sub>2</sub>

بعد از ۲۴ ساعت، هنگامی که سلول‌ها به تراکم ۸۰٪ رسیدند، پودر نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> اتوکلاو شد، استوک ۱ mg/ml از این نانوذرات در محیط کشت DMEM ساخته شد و تحت نوسانات اولتراسونیک قرار گرفت در ادامه برای حذف تجمعات نانوذرات ۱۰ درصد FBS به استوک نانوذرات اضافه شد و غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ساخته شدند و برای تیمار سلول‌های MCF-7 به کار گرفته شدند. بعد از ۴-۲ ساعت سلول‌های تیمار

### آزمون قطعه قطعه شدن DNA

به منظور بررسی میزان قطعه قطعه شدن DNA و به علاوه، تأیید نتایج حاصل از میکروسکوپ فلورسنت، تعداد  $3 \times 10^5$  سلول طبق شرایط ذکر شده با غلظت‌های ۰، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> تیمار شدند و پس از گذشت ۴۸ ساعت سلول‌ها با بافر لیز کننده (۱۰ NaCl میلی‌مولار، ۲۰ Tris-HCl میلی‌مولار، ۱ EDTA میلی‌مولار) لیز شدند و سپس SDS (۱۰٪) وزنی/حجمی) به محلول اضافه شد. در مرحله‌ی بعد ۳۰ μl پروتئیناز K به محلول حاصل اضافه شد و میکروتیوب‌ها در دمای ۳۷°C برای یک شبانه روز انکوبه شدند. در نهایت نمونه‌های DNA با بافر لودینگ (۳۰٪ وزنی/حجمی گلیسرول، ۲۵٪ وزنی/حجمی بروموفنل بلو) مخلوط شده و هریک از نمونه‌ها در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵٪ بارگذاری شدند. بعد از انجام الکتروفورز قطعات DNA از هم جدا شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

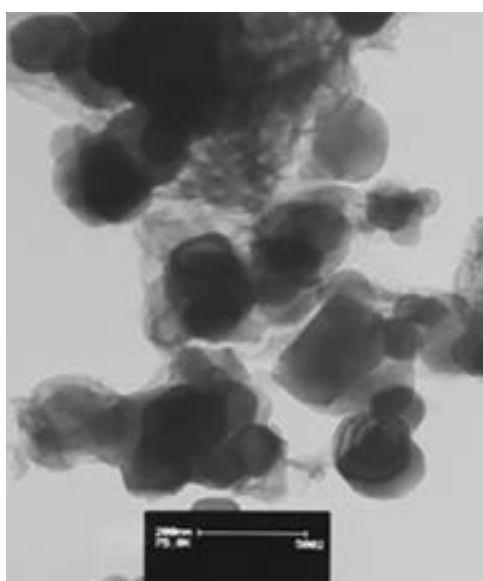
### روش آماری

تمامی داده‌های به دست آمده از این پژوهش حاصل دو تا سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بوده و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 و آزمون آماری Student-t-test مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفت و داده‌ها با ارزش  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شدند.

### یافته‌ها

#### تعیین مشخصات نانوذرات N-TiO<sub>2</sub>

همانطور که در شکل ۱ مشخص است، مورفولوژی نانوذرات به صورت کروی (spherical) است که منطبق با آنتاز بودن نانوذرات است و اندازه‌ی متوسط نانوذرات بین ۶۰-۸۰ نانومتر به دست آمد (شکل ۱). همچنین آنالیزهای DLS نشان داد که اندازه نانوذرات هنگامی که فقط در آب دیونیزه یا محیط کشت حل می‌شوند تقریباً زیاد است (به ترتیب ۷۷۳ و ۹۵۱)، این درحالی است که هنگامی که این نانوذرات در محیط کشت همراه با ۱۰٪ FBS حل می‌شوند، اندازه نانوذرات به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد و به حدود سایز اولیه (۲۲±۸۸) می‌رسد (جدول ۱).



شکل ۱: تعیین مشخصات نانوذرات N-TiO<sub>2</sub>. تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانوذرات N-TiO<sub>2</sub>

جدول ۱: تعیین مشخصات نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> از طریق آنالیزهای DLS

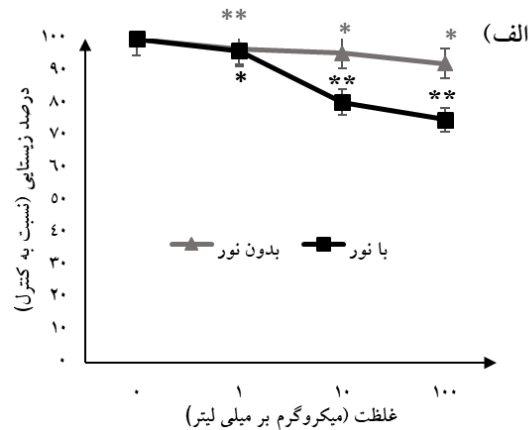
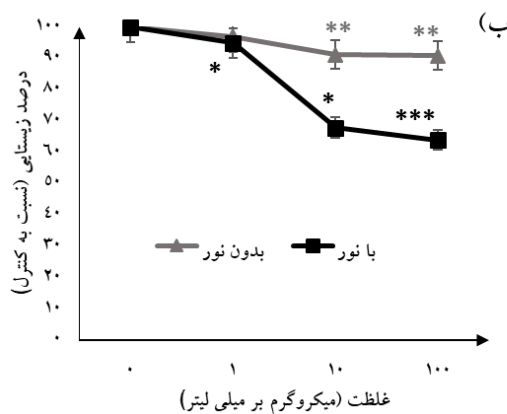
شرایط نانوذره در زمان تعیین سایز	سایز نانوذره (nm)
نانوذره + آب	۷۷۳±۲۴
نانوذره + محیط کشت	۹۵۱±۵۵
نانوذره + محیط کشت + FBS ۱۰٪	۸۸±۲۲

**تأثیر نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> بر روی زیستایی و رشد سلول‌های MCF-7**

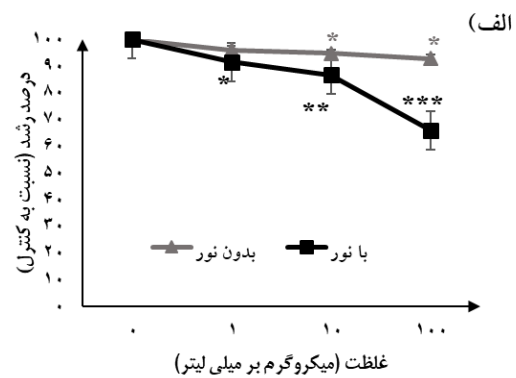
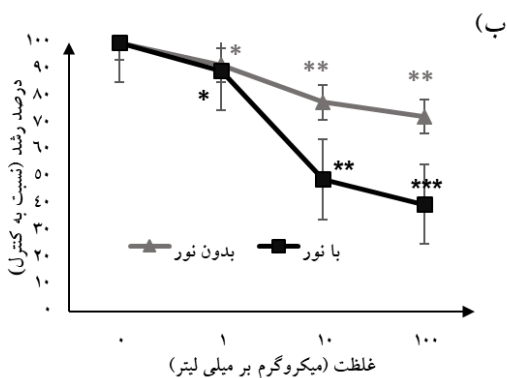
آزمون دفع رنگ تریپان بلو برای محاسبه تغییرات ایجاد شده در میزان زیستایی و رشد سلول‌های MCF-7 تحت تأثیر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید دوپه شده با نیتروژن انجام شد.

نتایج نشان می‌دهند که نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در شرایط تاریکی و ۲۴ ساعت پس از تیمار تأثیر چندانی بر روی زیستایی و رشد سلول‌های MCF-7 تا غلظت ۱۰۰ μg/ml اعمال نمی‌کنند (بیشتر از ۹۰٪ (نمودار ۱-الف) و (نمودار ۲-الف). با این حال، میزان رشد سلولی در غلظت ۱۰۰ μg/ml و ۴۸ ساعت پس از تیمار به ۷۰٪ می‌رسد (نمودار ۲-ب). اما در حضور نور مرئی میزان زیستایی و

رشد سلولی به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد، به طوری که ۴۸ ساعت پس از تیمار میزان زیستایی سلول‌ها در غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب به ۶۷/۸۷ و ۶۳/۹۳ درصد (نمودار ۱-ب)؛ و میزان رشد سلولی در همین غلظت‌ها به ترتیب به ۴۹/۱۶ و ۳۹/۶۶ درصد می‌رسد (نمودار ۲-ب). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نور مرئی قادر است نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> را فعال کند و اثرات آنها را افزایش دهد، همچنین میزان مرگ سلولی و مهار رشد القا شده توسط این نانوذرات وابسته به زمان و غلظت بوده و ۴۸ ساعت پس از تیمار میزان مهار رشد و مرگ سلولی نسبت به کنترل به طور معناداری ( $P < 0.05$ ) افزایش می‌یابد.



**نمودار ۱:** بررسی تأثیرات نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> بر روی زیستایی سلول‌های MCF-7، (الف) ۲۴ ساعت پس از تیمار و (ب) ۴۸ ساعت پس از تیمار، در حضور و غیاب نور مرئی ( $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$ )



**نمودار ۲:** بررسی تغییرات القا شده توسط نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> بر روی رشد سلول‌های MCF-7، (الف) ۲۴ (ب) ۴۸ ساعت بعد از تیمار، در حضور و غیاب نور مرئی ( $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$ )

تشخیص نوع مرگ سلولی از طریق میکروسکوپ فلورسنت و

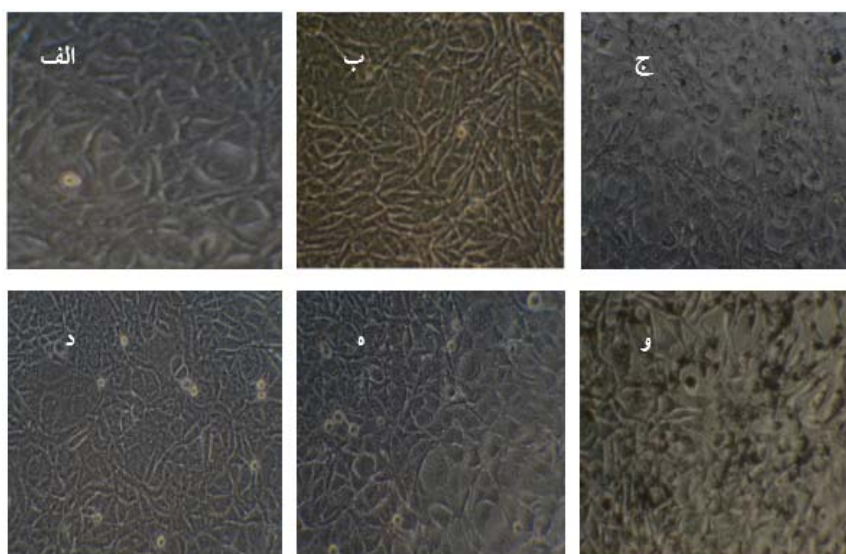
رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید

آکریدین اورنج توسط هردو سلول زنده و مرده جذب می‌شود و اگر به نوکلئیک اسید دو رشته‌ای (DNA) متصل شود رنگ سبز ایجاد می‌کند، اگر به نوکلئیک اسید تک رشته متصل شود (RNA) رنگ قرمز ایجاد می‌شود. اما اتیدیوم بروماید تنها توسط سلول‌های مرده جذب می‌شود و با اتصال به DNA رنگ قرمز متصاعد می‌کند. از این رو سلول‌های زنده هسته‌ای با رنگ سبز روشن یکنواخت و ساختار منظم دارند. رنگ هسته سلول‌هایی که در مرحله آپوپتوز ثانویه هستند و تمامیت غشای سلولی را از دست داده‌اند و در مراحل آخر آپوپتوز می‌باشند نارنجی تا قرمز است که به علت ناتوانی در دفع اتیدیوم بروماید و اتصال آن با کروماتین متراکم یا قطعه قطعه است. سلول‌های نکروزی هسته‌ای یکنواخت با رنگ نارنجی یا قرمز و با ساختار متراکم دارند.

تغییرات ریخت‌شناسی ایجاد شده پس از تیمار با نانوذرات

$N-TiO_2$

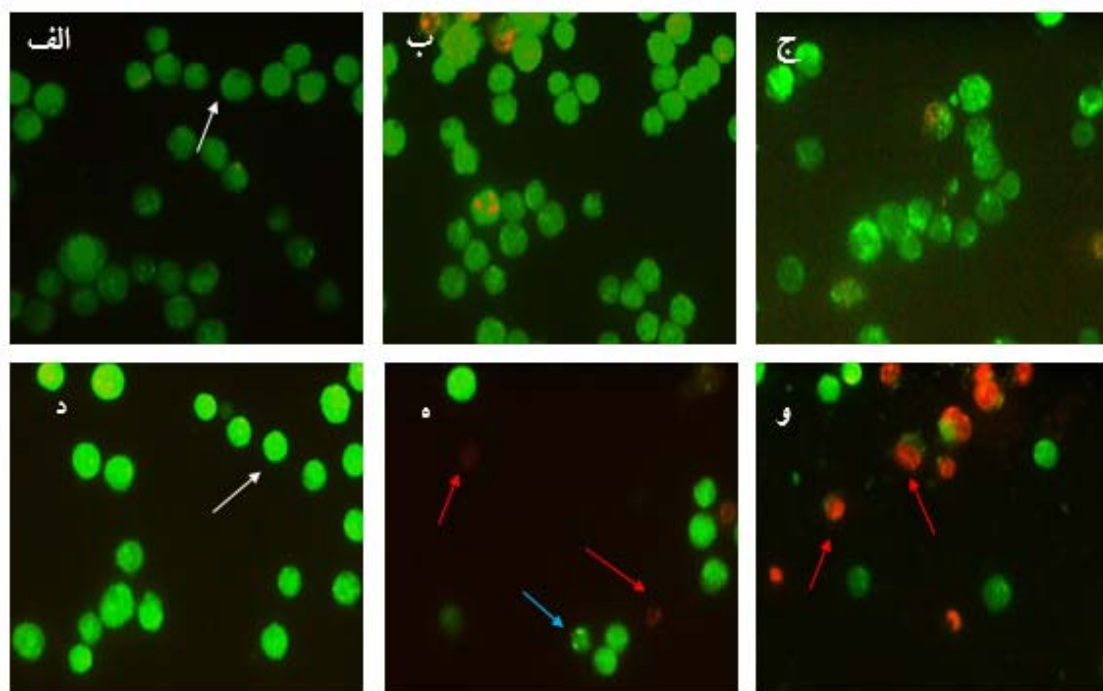
بررسی تغییرات ریخت‌شناسی یا مورفولوژی سلول‌های MCF-7 تیمار شده با غلظتی از نانوذرات  $N-TiO_2$  که باعث ۵۰٪ مهار رشد می‌شود، با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس نشان دهنده تغییرات در ظاهر سلول‌های تیمار شده می‌باشد. سلول‌های MCF-7 به طور طبیعی به فرم اپیتلیالی هستند، به ترتیبی که در شکل ۲-الف و د مشاهده می‌شود. تغییرات ایجاد شده شامل مهار رشد این سلول‌ها و خارج شدن این سلول‌ها از شکل طبیعی، مانند وجود هسته‌های بزرگ می‌باشد. همچنین می‌توان تغییرات ظاهری سلول‌ها و وجود سلول‌های مرده را در غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده کرد (شکل ۲-ه، و).



**شکل ۲:** بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های MCF-7، ۴۸ ساعت پس از تیمار با نانوذرات  $N-TiO_2$  توسط میکروسکوپ نوری معکوس و بزرگ‌نمایی ۳۲X. الف) نمونه کنترل نور زنده، ب) سلول‌های MCF-7 تیمار شده با  $10 \mu\text{g/ml}$  از نانوذرات  $N-TiO_2$  در غیاب نور مرئی، ج) سلول‌های MCF-7 تحت تأثیر غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات  $N-TiO_2$  در غیاب نور مرئی، د) سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوذرات  $N-TiO_2$  و قرار گرفته تحت تابش نور مرئی به مدت ۵ دقیقه، ه) سلول‌های MCF-7 تحت تأثیر غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات  $N-TiO_2$  که به مدت ۵ دقیقه در معرض نور مرئی قرار گرفته است، و) سلول‌های MCF-7 که با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات  $N-TiO_2$  تیمار شده است و به مدت ۵ دقیقه در معرض نور مرئی قرار گرفته است.

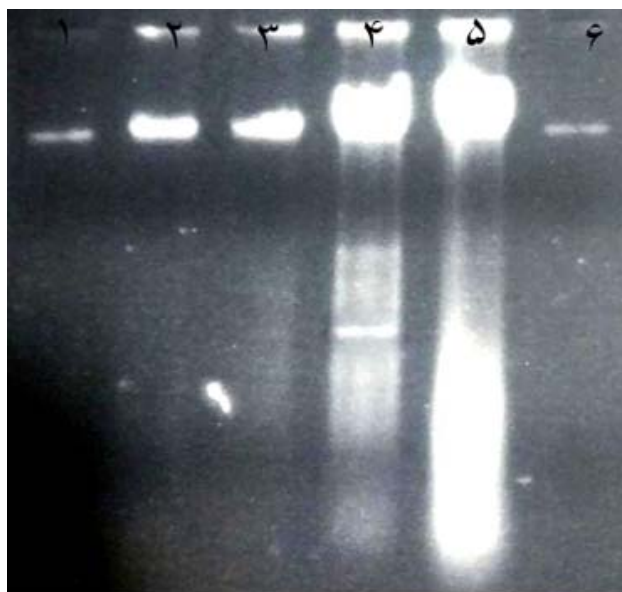
(شکل ۳- الف و د). در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حضور نور مرئی سلول‌هایی که در حالت آپوپتوز اولیه هستند (نقاط سبز روشن در داخل هسته) (فلش‌های آبی) و سلول‌هایی که در مرحله آپوپتوز ثانویه (فلش‌های قرمز) هستند (رنگ قرمز یا نارنجی با DNA قطعه قطعه شده) مشخص هستند (شکل ۳- ه). همین‌طور در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حضور نور مرئی سلول‌هایی که در مرحله‌ی آپوپتوز اولیه (فلش‌های آبی) هستند به میزان کمتر و سلول‌هایی که در مرحله‌ی آپوپتوز ثانویه (فلش‌های قرمز) هستند به میزان بیشتر، قابل مشاهده می‌باشند (شکل ۳- و).

برای بررسی اثرات آپوپتوزی نانوذره N-TiO<sub>2</sub> از میکروسکوپ فلورسنت و رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج استفاده شد (شکل ۳). همان‌طور که در شکل مشخص است، تعداد سلول‌هایی که در مرحله آپوپتوز اولیه (فلش‌های آبی) و ثانویه (فلش‌های قرمز) هستند، در حضور نور مرئی در غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش داشته است (شکل ۳- ه، و). همان‌طور که مشاهده می‌شود، نمونه‌های کنترل نور زده و نور نزده هیچ یک از نشانه‌های آپوپتوز، نکروز یا اتوفازی را نشان نمی‌دهند (فلش‌های سفید سلول‌های سالم را نشان می‌دهد).



**شکل ۳:** تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در حضور و غیاب نور مرئی ۴۸ ساعت پس از تیمار، بزرگ‌نمایی ۳۲X. الف) سلول‌های کنترل در شرایط تاریکی، ب) سلول‌های MCF-7 تیمار شده با ۱۰ µg/ml از نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در غیاب نور مرئی، ج) سلول‌های MCF-7 تیمار شده با ۱۰۰ µg/ml از نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در غیاب نور مرئی، د) نمونه کنترل در حضور نور مرئی، ه) سلول‌های MCF-7 در غلظت ۱۰ µg/ml از نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در حضور نور مرئی، و) سلول‌های MCF-7 در غلظت ۱۰۰ µg/ml از نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در حضور نور مرئی. (فلش‌های سفید: سلول‌های سالم، فلش‌های آبی: سلول‌هایی که در مرحله آپوپتوز اولیه هستند، فلش‌های قرمز: سلول‌هایی که در مرحله آپوپتوز ثانویه هستند).





**شکل ۴:** آزمون قطعه قطعه شدن DNA برای غلظت‌های ۰، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> ۴۸ ساعت پس از تیمار. چاهک ۱ نمونه کنترل نور زده، چاهک ۲ غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در غیاب نور مرئی، چاهک ۳ غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در غیاب نور مرئی، چاهک ۴ غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در حضور نور مرئی، چاهک ۵ غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در حضور نور مرئی، چاهک ۶ نمونه کنترل نور زده.

مرگ سلولی باشد (شکل ۴، چاهک ۵).

#### آزمون قطعه قطعه شدن DNA

آنزیم‌هایی مانند DNase در فرایند مرگ سلولی توسط کاسپازها فعال شده و DNA را در ناحیه بین نوکلئوزوم‌ها برش می‌دهند و مخلوطی از قطعات DNA را به وجود می‌آورند که طول قطعات مضربی از ۱۸۰ جفت باز یعنی فاصله بین نوکلئوزوم‌ها می‌باشد. از این قطعات نردبان مانند به عنوان شاخص مولکولی آپوپتوز استفاده می‌شود. همان‌طور که مشاهده می‌شود نمونه‌های کنترل نور زده و نور زده قطعه قطعه شدن DNA را نشان نمی‌دهند (شکل ۴، چاهک‌های ۱ و ۶) که به این معنی است که DNA استخراج شده از نمونه کنترل سالم بوده و مرگ سلولی را نشان نمی‌دهد. در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذره تیتانیوم دی‌اکسید دوپه شده با نیتروژن در حضور نور مرئی حالت نردبانی (ladder) مشاهده می‌شود که بیانگر وقوع آپوپتوز است (شکل ۴، چاهک ۴) و در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر این حالت پررنگ‌تر شده و شبیه حالت لکه (Smear) مشاهده می‌شود که می‌تواند بیانگر میزان بیشتر

#### بحث

در این مطالعه اثرات نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید دوپه شده با نیتروژن بر روی مرگ سلولی، مهار رشد و القای آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 بررسی شد. بدین منظور ابتدا از آزمون دفع رنگ تریپان بلو برای بررسی میزان زیستایی و رشد سلول‌های MCF-7 ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار با نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در حضور نور مرئی و در غیاب نور مرئی استفاده شد. پس از به دست آوردن IC<sub>50</sub> (میزان غلظتی از دارو که باعث ۵۰٪ مهار رشد می‌شود)، از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج/اتیدیم بروماید و آزمون قطعه قطعه شدن DNA به منظور بررسی نوع مرگ سلولی استفاده شد.

نتایج حاصل از آزمون دفع رنگ تریپان بلو نشان داد که کارایی نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> هنگامی که تحت تابش نور مرئی قرار می‌گیرند

باشد و یا وقوع نکروآپوپتوزیز (necroptosis) که در غیاب فاگوسیتوز (مثل شرایط کشت سلول) اتفاق می‌افتد، باشد.<sup>۳۴</sup> Lagopati و همکاران نشان دادند که القاء آپوپتوز و آسیب DNA در سلول‌های اپیتلیالی سرطان پستان رده MDA-MB-468 که بعد از تیمار با نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> ایجاد می‌شود به دلیل افزایش بیان Bax و شکست PARP به واسطه کاسپازها است.<sup>۱۵،۱۴</sup> در مطالعه دیگری Murugan و همکاران بیان کردند که بیان پروتئین‌های سیتوکروم c در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> افزایش می‌یابد و منجر به القای آپوپتوز می‌شود.<sup>۳۳</sup>

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه پتانسیل‌های ضد سرطانی نانوذرات تیتانیوم دی-اکسید دوپه شده با نیتروژن بررسی شد و نتایج نشان داد که نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> تنها در حضور نور مرئی اثرات مهار رشدی و القای آپوپتوز را در سلول‌های MCF-7 نشان دادند. همچنین در این مطالعه نشان داده شد که نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> قادر به القای آپوپتوز در رده سلولی MCF-7 است.

با توجه به این نتایج و نتایج حاصل از مطالعات صورت گرفته توسط محققان به منظور بررسی اثرات نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید دوپه شده و دوپه نشده بر روی انواع مختلفی از سلول‌های سرطانی، به نظر می‌رسد که نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید دوپه شده با نیتروژن می‌توانند به عنوان یک کاندید بالقوه برای مطالعات آتی در درمان فتوکاتالیتیکی سرطان پستان مورد توجه قرار بگیرند.

### سپاسگزاری

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از پژوهانه بنیاد ملی علم ایران (INSF) گرنت شماره ۹۲۰۳۰۱۰۲، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و همچنین دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی جهت حمایت این کار ابراز می‌دارند.

به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد. این در حالی است که در غیاب نور مرئی این ذرات تأثیر چندانی بر روی زیستایی و رشد سلول‌های MCF-7 ندارند. نتایج مطالعات ما نشان داد که تأثیر این نانوذرات وابسته به زمان و غلظت است، به طوری که IC<sub>50</sub> در غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۴۸ ساعت پس از تیمار مشاهده شد. تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی تأثیر نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> روی سلول‌های MCF-7 انجام نشده است، اما مطالعات دیگری تأثیر این نانوذرات را بر چند رده سلولی بررسی کرده‌اند. برای مثال Li و همکاران میزان سمیت نانوذرات TiO<sub>2</sub> خالص و N-TiO<sub>2</sub> را در حضور و در غیاب نور مرئی مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها دریافتند که نمونه‌های N-TiO<sub>2</sub> جذب بهتر و خاصیت کشندگی بهتری نسبت به TiO<sub>2</sub> تحت تأثیر نور مرئی دارند. بنابراین N-TiO<sub>2</sub> پتانسیل بهتری به عنوان یک حساسگر نوری برای فتودینامیک تریای سرطان‌ها دارد.<sup>۳۱، ۳۲</sup> همچنین موسوی و همکاران نشان دادند که نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در حضور نور مرئی سبب مهار رشد و کاهش زیستایی در سلول‌های K562 می‌شوند.<sup>۲۹</sup> به منظور بررسی وقوع آپوپتوز به دنبال تیمار سلول‌ها با نانوذرات N-TiO<sub>2</sub>، ۴۸ ساعت پس از تیمار، نمونه‌ها از طریق رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج/تیدیوم بروماید و مشاهده توسط میکروسکوپ فلورسنت، بررسی شدند. تصاویر میکروسکوپ فلورسنت داده‌های حاصل از آزمون دفع رنگ تریپان بلو را تأیید کرد. به این صورت که بیشترین میزان سلول‌های مرده در مقایسه با کنترل در غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حضور نور مرئی مشاهده شد. در شکل ۳-ه، و، سلول‌هایی که دارای نقاط سبز هستند (آپوپتوز اولیه) و همچنین سلول‌هایی که دارای رنگ قرمز به همراه کروموزوم قطعه قطعه هستند (آپوپتوز ثانویه) قابل مشاهده است. مطابق این نتایج، Murugan و همکاران وقوع آپوپتوز را در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوذرات TiO<sub>2</sub> از طریق میکروسکوپ فلورسنت نشان دادند.<sup>۳۳</sup> به منظور تأیید نتایج حاصل از میکروسکوپ فلورسنت، از آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. الگوی قطعه قطعه شدن DNA سلول‌های MCF-7 ۴۸ ساعت پس از تیمار با نانوذرات N-TiO<sub>2</sub> در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت نردبانی (ladder) و در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت لکه (smear) مشاهده شد که می‌تواند بیانگر میزان بیشتر مرگ سلولی

## References

- Rafiemanesh H, Mehtarpour M, Khani F, Hesami SM, Shamlou R, Towhidi F, et al. Epidemiology, incidence and mortality of lung cancer and their relationship with the development index in the world. *J Thorac Dis* 2016; 8(6): 1094–102.
- Enayatrads M, Amoori N, Salehiniya H. Epidemiology and trends in breast cancer mortality in Iran. *Iran J Public Health* 2015; 44(3): 430–1.
- Eccles SA, Aboagye EO, Ali S, Anderson AS, Armes J, Berditchevski F, et al. Critical research gaps and translational priorities for the successful prevention and treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2013; 15(5) : 92-29.
- Sambi M, Haq S, Samuel V, Qorri B, Haxho F, Hill K, et al. Alternative therapies for metastatic breast cancer: multimodal approach targeting tumor cell heterogeneity. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2017;9:85—3
- Lee JJ, Yazan LS, Abdullah CAC. A review on current nanomaterials and their drug conjugate for targeted breast cancer treatment. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12: 2373–84.
- Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013; 24(suppl\_6): 7–23.
- Provenzano E, Pinder SE. Modern therapies and iatrogenic changes in breast pathology. *Histopathology*. 2017;70(1):40-55.
- Grobmyer SR, Zhou G, Gutwein LG, Iwakuma N, Sharma P, Hochwald SN. Nanoparticle delivery for metastatic breast cancer. *Maturitas*. 2012;73(1):19-26.
- Jabir NR, Tabrez S, Ashraf GM, Shakil S, Damanhour GA, Kamal MA. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:4391–408.
- Chidambaram M, Manavalan R, Kathiresan K. Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations. *J Pharm Pharm Sci* 2011;(1)14:67-77.
- Cuenca AG, Jiang H, Hochwald SN, Delano M, Cance WG, Grobmyer SR. Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer*. 2006;107(3):459-66.
- Rajh T, Dimitrijevic NM, Bissonnette M, Koritarov T, Konda V. Titanium dioxide in the service of the biomedical revolution. *Chem Rev*. 2014;114(19):10177-216.
- Jukapli NM, Bagheri S. Recent developments on titania nanoparticle as photocatalytic cancer cells treatment. *J Photochem. Photobiol. B, Biol*. 2016;163:421-30.
- Lagopati N, Kitsiou P, Kontos A, Venieratos P, et al. Photo-induced treatment of breast epithelial cancer cells using nanostructured titanium dioxide solution. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2010;214(2): 215-23.
- Lagopati N, Tsilibary E-P, Falaras P, Papazafiri P, Pavlatou EA, Kotsopoulou E, et al. Effect of nanostructured TiO<sub>2</sub> crystal phase on photoinduced apoptosis of breast cancer epithelial cells. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:3219–30.
- Raliya R, Singh Chadha T, Haddad K, Biswas P. Perspective on nanoparticle technology for biomedical use. *Curr Pharm Des*. 2016;22(17):2481-90.
- Yin ZF, Wu L, Yang HG, Su YH. Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide. *Phys Chem Chem Phys*. 2013;15(14):4844-58.
- Cai R, Hashimoto K, Itoh K, Kubota Y, Fujishima A. Photokilling of malignant cells with ultrafine TiO<sub>2</sub> powder. *Bull Chem Soc Jpn*. 1991;64(4):1268-73.
- Cai R, Kubota Y, Shuin T, Sakai H, Hashimoto K, Fujishima A. Induction of cytotoxicity by photoexcited TiO<sub>2</sub> particles. *Cancer Res*. 1992;52(8):2346-8.
- Huang N-P, Min-hua X, Yuan C-W, Rui-rong Y. The study of the photokilling effect and mechanism of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles on U937 cells. *J Photochem Photobiol A Chem*. 1997;108(2-3):229-33.
- Zhang A-P, Sun Y-P. Photocatalytic killing effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *World J Gastroenterol*. 2004;10(21):3191–3.
- Park E-J, Yi J, Chung K-H, Ryu D-Y, Choi J, Park K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett*. 2008;180(3):222-9.
- Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(4):250-81.
- Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem. Photobiol. B, Biol*. 2009;96(1):1-8.
- Banerjee AN. The design, fabrication, and photocatalytic utility of nanostructured semiconductors: focus on TiO<sub>2</sub>-based nanostructures. *Nanotechnol Sci Appl*. 2011;4:35–65.
- Gupta SM, Tripathi M. A review of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Chin Sci Bull*. 2011;56(16):1639-57.
- Carp O, Huisman CL, Reller A. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Progress in solid state chemistry*. 2004;32(1):33-177.
- Asahi R, Morikawa T, Ohwaki T, Aoki K, Taga Y. Visible-light photocatalysis in nitrogen-doped titanium oxides. *science*. 2001;293(5528):269-71.

29. Moosavi MA, Sharifi M, Ghafary SM, Mohammadalipour Z, Khataee A, Rahmati M, et al. Photodynamic N-TiO<sub>2</sub> nanoparticle treatment induces controlled Ros-mediated autophagy and terminal differentiation of leukemia cells. *Sci Rep.* 2016;4(6):34413-23.
30. Khataee A, Zarei M, Moradkhannejhad L, Nourie S, Vahid B. Nitrogen doping of commercial TiO<sub>2</sub> nanoparticles for enhanced photocatalytic degradation of dye under visible light: Central composite design approach. *Adv Chem Lett.* 2013;1(1):24-31.
31. 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(1):356-62.
32. Li Z, Pan X, Wang T, Wang P-N, Chen J-Y, Mi L. Comparison of the killing effects between nitrogen-doped and pure TiO<sub>2</sub> on HeLa cells with visible light irradiation. *Nanoscale Res Lett.* 2013;8(1):96-2.
33. Murugan K, Dinesh D, Kavithaa K, Paulpandi M, Ponraj T, Alsalhi MS, et al. Hydrothermal synthesis of titanium dioxide nanoparticles: mosquitocidal potential and anticancer activity on human breast cancer cells (MCF-7). *Parasitol Res.* 2016;115:1085-96.
34. Mahassni SH, Al-Reemi RM. Apoptosis and necrosis of human breast cancer cells by an aqueous extract of garden cress (*Lepidium ativum*) seeds. *Saudi J Biol Sci.* 2013;20(2):131-9.